

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Martha Merrow

**Circadiane Rhythmen und Ihr Einfluss auf die Überlebensfähigkeit, Differenzierung
und Stressresistenz eines Zellkulturmodells für gealterte Nervenzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephan Englberger

aus

Weilheim i. OB.

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Martha Merrow, PhD

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jan Rémi

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Mirjam Geibel, PhD

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	4
1.1 Philosophische und historische Grundlagen des Naturverständnisses im 21. Jahrhundert	4
1.1.1 Paradigmenwechsel als Grundlage wissenschaftlichen Fortschritts.....	4
1.1.2 Kritische Betrachtung des aktuellen naturwissenschaftlichen Paradigmas	5
1.2 Das circadiane System	13
1.2.1 Vorkommen, Eigenschaften und molekularer Aufbau circadianer Uhren.....	13
1.2.2 Die Synchronisation der zellulären circadianen Uhren in einem mehrzelligen Organismus.....	16
1.3 Die Relevanz der circadianen Uhr für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Erkrankungen	19
1.4 Neurodegenerative Erkrankungen.....	20
1.5 Die Rolle circadianer Dysfunktionen für die Entstehung und Aufrechterhaltung neurodegenerativer Erkrankungen.....	25
1.6 Hypothese der vorliegenden Arbeit	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Material.....	29
2.2 Zusammenfassung der Methodik.....	32
2.3 Grundsätzliche Methodik der Zellkultur	34
2.4 Grundsätzliche Methodik der Experimente.....	35
2.5 Analyse des Proteingehalts und des Proteoms.....	37
2.5.1 Anzucht und Inkubation.....	37
2.5.2 Zellernte am Tag 10 nach Seneszenzinduktion.....	38
2.5.3 Proteinextraktion.....	38
2.6 Messung der Zelldifferenzierung	39
2.6.1 Aussaat und Inkubation	40
2.6.2 Fixierung und Färbung mit Coomassie	40
2.6.3 Auswertung der Coomassie gefärbten Zellen.....	40

2.6.4	Grundlagen der Messung der Exprimierung neuronenspezifischer Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung	42
2.6.5	Klasse III β -Tubulin und Schwere Kette des Neurofilaments.....	43
2.6.6	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung	43
2.6.7	Generierung der Bilder und Auswertung.....	44
2.7	Messung der Überlebensfähigkeit der Zellen	45
2.7.1	Messung der Überlebensfähigkeit mittels des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assays und des MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assays	45
2.7.1.1	Bestimmung der Sensitivität des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assays und des MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assays.....	46
2.7.2	Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit mittels Promega RealTime-Glo	46
2.7.2.1	Bestimmung der Assay-Linearität in Abhängigkeit der Zellzahl	47
2.7.2.2	Bestimmung der optimalen Zelldichte seneszenten Zellen.....	47
2.7.2.3	Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit der Zellen unter den unterschiedlichen Temperaturregimes	48
2.8	Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit unter Bedingungen oxidativen Stresses	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Messung der Zelldifferenzierung	50
3.1.1	Vergleich der Neuritenausbildung und Zellkonnektivität mittels Coomassie-Färbung	50
3.1.2	Messung der Exprimierung neuronenspezifischer Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung	53
3.2	Messung der Überlebensfähigkeit seneszenten Zellen	55
3.2.1	Bestimmung der Sensitivität des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assays und des MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assays.....	55
3.2.2	Bestimmung der Assay-Linearität des RealtimeGlo-Assays in Abhängigkeit der Zellzahl	55
3.2.3	Bestimmung der optimalen Zelldichte seneszenten Zellen.....	56
3.2.4	Bestimmung der Metabolisierungs- / bzw. Überlebensfähigkeit mittels des RealtimeGlo Assays	56
3.3	Messung der Überlebensfähigkeit seneszenten Zellen unter Bedingungen oxidativen Stresses	58

4	Diskussion	63
4.1	Zusammenfassung	63
4.2	Grundsätzliche Schwächen und Stärken der vorgelegten Studie	63
4.3	Die einzelnen Ergebnisse im Kontext bisheriger Erkenntnisse	64
4.3.1	Analyse des Proteingehalts und des Proteoms	64
4.3.2	Messung der Zelldifferenzierung	64
4.3.3	Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit mittels Promega RealTime-Glo	66
4.3.4	Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit mittels Promega RealTime-Glo unter Bedingungen oxidativen Stresses	67
4.4	Implikationen für die Durchführung von Zellkulturstudien	68
5	Literaturverzeichnis	70
	Eidesstattliche Versicherung	84
	Danksagung	85

Zusammenfassung

Mit der stetig steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung steigt auch die Prävalenz der Alzheimerdemenz und anderer altersabhängiger neurodegenerativen Erkrankungen an. Diese Erkrankungen belasten nicht nur die jeweiligen Patientinnen und Patienten sowie deren Angehörige, sondern auch das Gesundheitswesen. Trotz intensiver Forschungsbemühungen seit über 100 Jahren, welche sich primär auf bei diesen Erkrankungen pathologischerweise vorhandene Proteinaggregate stützten, sind die therapeutischen Möglichkeiten, neurodegenerative Erkrankungen zu verlangsamen, zu heilen oder gar zu verhindern sehr gering. Einen Perspektivenwechsel vornehmend weisen Forschungsergebnisse zunehmend auf einen systemischen Zusammenhang von neurodegenerativen Erkrankungen mit chronischen Entzündungsprozessen, Störungen von Metabolismus, Inflammation, oxidativem Stress und anderen systemischen Krankheitsursachen hin. Da diese Prozesse durch circadiane Rhythmen in hohem Maße mitbeeinflusst werden, überrascht es nicht, dass zunehmend auch Zusammenhänge zwischen Störungen circadianer Rhythmik und dem Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen in den Blick neurowissenschaftlicher Forschung geraten.

Die Hypothese dieser Arbeit ist daher, dass sich Störungen der circadianen Rhythmik schädlich auf die Resistenz gegenüber Sauerstoffradikalen, die Protein-Homöostase, sowie die Gesundheit und das generelle Überleben von Säugetier-Nervenzellen auswirken. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die bereits als Modell etablierten murinen Neuroblastomzellen der N2a-Linie verwendet, welche durch die Zugabe eines Histon-Deacetylasehemmer (LBH-589) und die Reduktion des Serumgehalts im Nährmedium in einen Zustand künstlicher Zellalterung (Seneszenz) versetzt wurden.

Anschließend wurden die Zellen unterschiedlichen Temperaturbedingungen ausgesetzt (konstant 37°C, konstant 34 °C, zyklischer Wechsel im 12-Stunden-Rhythmus zwischen 34 °C und 37 °C). In der Population mit zyklischen Konditionen wird damit eine Synchronisierung (Entrainment) der „inneren Uhr“ erreicht, welche die Synchronisierung zellphysiologischer Vorgänge zur Folge hat. Nach 10 bzw. 11 Tagen unter diesen Bedingungen wurden die Zellen auf ihre Differenzierungsfähigkeit (Ausbildung von Nervenzellfortsätzen, Konnektivität der Zellen, Expressierung neuronenspezifischer Proteine), die Überlebensfähigkeit und die Überlebensfähigkeit unter Bedingungen von oxidativem Stress hin untersucht.

Dabei zeigte sich bezüglich der Fähigkeit zur Differenzierung, dass die Ausbildung neuronentypischer Zellfortsätze (Axone und Dendriten) durch die Umgebungstemperatur beeinflusst wird. Allerdings zeigte sich kein Vorteil einer zyklisch-wechselnden Umgebungstemperatur gegenüber einer konstant niedrigen Temperatur von 34 °C. Bezüglich der Expressierung neuronenspezifischer Unterschiede konnte kein Unterschied zwischen den Temperaturbedingungen festgestellt werden. Die basale Überlebensfähigkeit der Zellen unterschied sich in dem hier verwendeten Setting ebenso nicht wesentlich voneinander. Allerdings konnte ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der

Überlebensfähigkeit der Zellen unter Bedingungen oxidativen Stresses nachgewiesen werden. Dies weist auf eine zentrale Rolle intakter circadianer Rhythmizität für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und der Resistenz gegenüber oxidativem Stress in Nervenzellen hin. Diese Hinweise sollte in weiteren Forschungsarbeiten zum Thema weiterverfolgt werden. Da oxidativem Stress aber auch eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, metabolischen Erkrankungen und der Krebsentstehung zugeschrieben wird, haben die Ergebnisse dieser Arbeit auch für diese Krankheitsentitäten interessante Implikationen.

So böte sich hier für zukünftige Forschungsbemühungen der Versuch an, das Experiment mit verschiedenen Zellen nichtneuronalen Ursprungs zu wiederholen, um möglicherweise auch hier Hinweise für eine Mitbeteiligung gestörter circadianer Systeme an der Pathogenese zu finden aus denen sich dann entsprechende Präventions- und Therapieangebote ableiten ließen.

„so ist wieder jede Kreatur nur ein Ton, eine Schattierung einer großen Harmonie, die man auch im ganzen und großen studieren muss, sonst ist jedes Einzelne ein toter Buchstabe. Aus diesem Gesichtspunkte ist diese kleine Schrift geschrieben, das ist eigentlich das Interesse, das darinne verborgen liegt.“

Johann Wolfgang von Goethe in einem Brief an Karl Ludwig von Knebel, 1784¹

1 Einleitung

1.1 Philosophische und historische Grundlagen des Naturverständnisses im 21. Jahrhundert

1.1.1 Paradigmenwechsel als Grundlage wissenschaftlichen Fortschritts

„The answers you get depend on the questions you ask.“

— Thomas S. Kuhn ²

Die Geschichte des wissenschaftlichen Fortschritts ist die Geschichte davon, wie die etablierten Modelle die Welt zu erklären, durch neuere, oft radikal abweichende Modelle ersetzt werden. Wie Thomas Kuhn in seinem einflussreichen Werk *„The Structure of Scientific Revolutions“* darlegte, bezieht sich diese Form der Erneuerung unseres Weltverständnisses nicht nur auf einzelne, fachspezifische Theorien, sondern auch auf die basalen Paradigmen, die dem jeweils aktuellen wissenschaftlichen Denken zugrunde liegen. Diese Paradigmen sind ihrerseits bedingt durch die *„Konstellation gemeinsamer Vermutungen, Überzeugungen und Werte, welche eine Wissenschaftsgemeinschaft verbinden“*.^{3,4} Auch WissenschaftlerInnen sind demnach keine objektiven Betrachter der Realität, schließlich sind auch sie unweigerlich eingebunden in einen sozialen Kontext, wie etwa die Art der Gesellschaftsorganisation, vorherrschende Weltanschauungen, Wertvorstellungen, soziale Konventionen etc. Dies zu erkennen, heißt nicht etwa, einem radikalen Konstruktivismus anzuhängen und davon auszugehen, dass es gar keine Realität außerhalb des menschlichen Geistes gäbe. Aber es heißt einzugestehen, dass unsere Herangehensweise an Probleme genauso wie die Art von Fragen, die wir in Form von Hypothesen an die Welt stellen, die Art von Experimenten, die uns einfallen, um unsere Hypothesen zu überprüfen und die Art, wie wir die gewonnenen Erkenntnisse interpretieren, zu einem beträchtlichen Teil von dem sozialen Kontext abhängen, in den wir eingebunden sind.

Es heißt sich einzugestehen, dass die Beziehung zwischen wissenschaftlicher Erkenntnis und den vorherrschenden Grundannahmen über die Beschaffenheit der Welt keine Einbahnstraße ist, in der die Wissenschaft das Weltbild in regelmäßigen Abständen *„updated“*. Die Beziehung ist vielmehr eine wechselseitige, in der die vorherrschende Weltanschauung einen großen Einfluss darauf hat, welche wissenschaftlichen Erkenntnisse überhaupt erst generiert werden können, welche Hypothesen im *Mainstream* *„denkbar“* und *„plausibel“* sind und daher einer näheren Untersuchung würdig erscheinen. Entsprechend führt eine Veränderung der gesamtgesellschaftlichen Gegebenheiten auch zu einer Veränderung der Art und Weise, wie (natur)wissenschaftliche Erkenntnisse erlangt und interpretiert werden. Ist die Umwälzung groß genug, kommt es gar zu einem

Paradigmenwechsel, der viele der bisher unhinterfragten Grundannahmen in Frage stellt und den Raum des Denkbaren erweitert.

Beispiele für solche Paradigmenwechsel sind die revolutionären Umwälzungen durch die Evolutionstheorie im 19. Jahrhundert ebenso wie die radikale Infragestellung des jahrhundertlang gültigen, streng deterministisch-mechanistisch-reduktionistischen Weltbilds der klassischen Physik durch die Quantentheorie zu Beginn des 20. Jahrhunderts. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts hat sich schließlich in den Geowissenschaften ein Paradigmenwechsel ereignet⁵, dessen Auswirkungen auch die Biologie und Medizin nicht unberührt ließen. So kam es zu einem fundamentalen Wandel im Verständnis der Erde, der von dem renommierten Klimawissenschaftler J.H. Schellnhuber als „zweite kopernikanische Revolution“ bezeichnet wurde.⁶ Während die Erde zuvor verstanden wurde als ein passiver steinerner Spielball physikalischer Einflussfaktoren, ist sie dem neu geschaffenen Wissenschaftszweig der „Earth System Science“ zufolge ein „self-regulating system comprised of physical, chemical, biological and human components“⁷.

Die Erde wird demnach heute verstanden als ein sich selbst regulierendes System, bei dem biologische, chemische und physikalische Einflussfaktoren untrennbar miteinander verwoben sind.^{8,9} Einigen Autorinnen und Autoren zufolge stellt die Erde gar einen nach der griechischen Erdgöttin Gaia benannten lebenden Superorganismus dar¹⁰⁻¹².

So umfassend die eben genannten, einzelnen Paradigmenwechsel auch sein mögen, weisen sie doch auf einen noch umfassenderen „Meta-Paradigmenwechsel“ hin, der im Gange zu sein scheint. Die Stoßrichtung der einzelnen Paradigmenwechsel Evolution, Quantentheorie, und der Erde als System ist schließlich dieselbe: Vor dem jeweiligen Paradigmenwechsel als fundamental getrennt betrachtete Entitäten sind nachher Teil eines größeren Ganzen.: Alle Lebewesen sind miteinander verwandt; die Eigenschaften von Elementarteilchen hängen auch vom Beobachter ab, Atmosphäre, Biosphäre, Land und Wasser sind untrennbar miteinander verwoben.

1.1.2 Kritische Betrachtung des aktuellen naturwissenschaftlichen Paradigmas

Je mehr wir über die Welt herausfinden, desto weniger scheint die reduktionistische Grundannahme der an Descartes, Galilei und Newton orientierten Naturwissenschaften – und damit praktisch des gesamten westlichen Weltbildes - zuzutreffen, wonach die Welt aus mechanischen Einzelteilen besteht, die auf deterministische Weise miteinander wechselwirken und gänzlich verstanden werden können, wenn sie zerlegt, isoliert und quantifiziert werden.

Diese veraltete Denkweise, die man wie Carl Woese als „fundamentalistischen Reduktionismus“¹³ bezeichnen kann, wurde in der Physik und den Geowissenschaften offenbar bereits weitgehend verlassen. In der Biologie und Medizin hingegen herrscht regelmäßig noch ein starker molekularer bzw. mechanistischer Reduktionismus vor. So wird davon ausgegangen, dass „Lebewesen (wie alles andere auch) dann vollkommen verstanden sind, wenn die Eigenschaften der sie aufbauenden Bestandteile verstanden sind.“¹³ Dieser Denkschule nach wird „der Organismus (und seine Entwicklung) als reines Epiphänomen seiner Gene“¹⁴ betrachtet.

Wie Carl Woese, einer der profiliertesten Biologen des 20. Jahrhunderts und Entdecker der Archaeen als dritter Domäne des Lebens auf der Erde, feststellte, ist dieses reduktionistische Narrativ der Biologie heute überholt und muss durch ein neues Verständnis der Realität ersetzt werden.¹³ Woese fordert daher dazu auf, eine Perspektive einzunehmen, in der Lebewesen nicht mehr als isolierte Maschinen, sondern als komplexe Systeme verstanden werden, die – genau wie die innerhalb eines Organismus anzutreffenden komplexen Subsysteme wie Organe, Zellverbände und Zellen- auf vielfältigste Weise miteinander verbunden sind.^{13,15}

Damit reiht er sich in die länger werdende Reihe von NaturphilosophInnen und -WissenschaftlerInnen ein, welche die seit Descartes vorherrschende Metapher von der „Natur als Maschine“ kritisieren und sich für einen äußerst tiefgreifenden Paradigmenwechsel aussprechen. Dieser Paradigmenwechsel beschränkt sich nicht allein auf einzelne Fachdisziplinen, sondern schließt unsere basalsten Grundüberzeugungen davon, was Natur ist und wie unsere Stellung als Menschen zueinander sowie zum Rest der Natur geartet ist, mit ein.¹⁶⁻²²

Ein Teil dieser Kritik bezieht sich darauf, dass die Metapher von der „Natur als Maschine“ ursächlich mitverantwortlich ist für die zahlreichen ökologischen Krisenerscheinungen, mit denen sich die Menschheit heute konfrontiert sieht.²²⁻²⁴ Dies wird unter anderem damit begründet, dass eine solche Art der Naturbetrachtung eine ethische Perspektive auf unseren Umgang mit der Natur von vornherein verstellt. Maschinen haben schließlich keinen inhärenten, über monetäre Erwägungen hinausgehenden, Wert, keine Rechte und keinen Anspruch auf ethische Behandlung.²⁵ Des Weiteren erfordert eine Maschine die Bedienung – oder zumindest regelmäßige Wartung – durch einen Außenstehenden. Diese Rolle, die in aller Regel dem Menschen zugedacht wird, postuliert eine fundamentale Trennung zwischen dem Mensch und dem Rest der Natur und reduziert die Natur weiter auf ein allein zum Wohle des Menschen existierendes Objekt, das nach Belieben verändert und ausgebeutet werden kann.²⁶ Der Mensch wird diesem Denkschema zufolge, wie von Descartes vorgedacht und auf den Punkt gebracht, zum „Herrscher und Besitzer der Natur“²⁷, während die gesamte Welt aufgeteilt wird in Geist und Materie (bei Descartes „*res cogitans*“ und „*res extensa*“).²⁸

So sehr Descartes auch in jenem Denkprozess, welcher schließlich im bekannten „Ich denke, also bin ich“ mündete, alle althergebrachten Überzeugungen hinterfragen wollte, übernahm der „Begründer der modernen Naturwissenschaft“ ironischerweise gerade große Teile des grundlegenden Verständnisses vom Verhältnis zwischen Geist und Materie sowie Mensch und dem Rest der Natur aus der tradierten jüdisch-christlichen Überlieferung.

So heißt es etwa in Genesis 1,28: *Seid fruchtbar und mehrt euch, füllt die Erde und unterwerft sie und waltet über die Fische des Meeres, über die Vögel des Himmels und über alle Tiere, die auf der Erde kriechen!*“ und im Psalm 8: *„Du hast ihn [den Menschen] als Herrscher eingesetzt über die Werke deiner Hände, alles hast du gelegt unter seine Füße: Schafe und Rinder, sie alle und auch die wilden Tiere, die Vögel des Himmels und die Fische im Meer, was auf den Pfaden der Meere dahinzieht.“*²⁹

Diese Kosmologie, wonach der Mensch mit seinem Geist ein qualitativ vom Rest der Natur getrenntes Wesen ist, welchem durch sein rationales Denkvermögen die Rolle eines

Herrschers zukommt, während der Rest der Natur - wie auch der menschliche Körper - als materielle Maschine betrachtet wird, ist bis heute das dominante Narrativ der westlichen Naturwissenschaften sowie des westlichen Denkens überhaupt und zeigt sich bereits in so alltäglichen Worten wie dem Begriff der „Umwelt“, oder „environment“, die deutlich machen, dass die Natur etwas ist, was außerhalb von uns Menschen liegt und uns umgibt. In der Biologie wird jedes Lebewesen als ein abgrenzbares „Individuum“ einer abgrenzbaren „Art“ betrachtet, in der Medizin herrscht - trotz aller Beteuerungen eines „biopsychosozialen Krankheitsmodells“ - die kategorielle Trennung von psychischen und körperlichen Erkrankungen weiterhin vor und es wird beständig nach „mechanistischen“ Erklärungen für allerlei Erkrankungen gesucht, die dann durch Medikamente therapiert werden sollen, welche nur einen einzelnen, isolierten Wirkstoff enthalten.

Im Bereich der Wirtschafts“wissenschaft“ erheben die aktuellen Dogmen der Ökonomie mit dem „Homo oeconomicus“ den egozentrischen Individualismus zum Grundprinzip menschlichen Handelns überhaupt, während sie gleichzeitig ein Wirtschaftssystem propagieren, dessen Basis unendliches Wachstum auf einem Planeten mit endlichen Ressourcen ist. Diese Denkmuster setzen implizit oder explizit eine fundamentale Trennung von „Arten“, Psyche und Körper, menschlichen Individuen untereinander, sowie dem Wirtschaftssystem und unseren natürlichen Lebensgrundlagen voraus.³⁰

Es ist hervorzuheben, dass, wie unter anderem der renommierte Anthropologe Phillipe Descola feststellt, diese Art der Welterklärung keineswegs in allen Kulturen vorherrscht, sondern ein Alleinstellungsmerkmal des westlichen Denkens ist, während insbesondere indigene Welterklärungsmodelle recht konsistent eine Allverbundenheit aller Lebewesen betonen und auch zwischen etwa Kultur und Natur keine Trennung vornehmen.^{31,32}

In der Cambridge Encyclopedia of Hunters and Gatherers heißt es dazu etwa: *„Hunter-gatherers usually focus on the interrelatedness of all systems in the natural world, incorporating at the same time the spiritual world and many aspects of the social world. Their traditional ecological knowledge (TEK) goes well beyond noting the interrelatedness of specific organisms; it embraces an all-encompassing world-view of total relationship.“*³³

Ebenso kann die „Einheit der Welt“ verstanden werden als das Fundament der weitverbreiteten – und auch im Westen an Zulauf gewinnenden - Philosophien des Buddhismus, Taoismus, und großen Teilen des Hinduismus (Vedanta).³⁴⁻³⁶ Darüber hinaus ist die Auflösung des „Ich“-Konzeptes zentraler Bestandteil diverser Meditationspraktiken und wird häufig als Hauptwirkung des Konsums psychedelischer Substanzen angegeben.³⁷

Auch innerhalb der westlichen Philosophie gab es Denkschulen wie etwa den Neoplatonismus, die ein ähnliches Weltbild der Nicht-Getrenntheit der Welt vertraten.³⁴

Ohne über den Wahrheitsgehalt der jeweiligen Weltbilder zu urteilen, kann also zumindest festgehalten werden, dass unser aktuelles, mechanistisch-individualistisches Weltbild philosophiegeschichtlich und global betrachtet eine große Ausnahme darstellt. Allerdings muss erwähnt werden, dass die dualistisch-mechanistische westliche Weltsicht durch die Kolonialisierung, den Imperialismus und die ökonomische Globalisierung weltweit – häufig äußerst gewaltsam - verbreitet wurde und seitdem auch in zahlreichen Kulturen außerhalb Europas, Nordamerikas und Australiens zum dominanten Narrativ der

Welterklärung geworden ist.³²

Die dem westlichen Denken eigene Metapher von der „Natur als Maschine“ und die Mythologie vom Menschen als isoliertes, über dem Rest der Natur stehendes Wesen bilden in der Argumentation einiger zeitgenössischer PhilosophInnen und NaturwissenschaftlerInnen die philosophische Grundlage, welche die zunehmend stattfindende Ausbeutung der natürlichen Ressourcen und die damit verbundenen Probleme wie beispielsweise das Artensterben, die Versauerung der Ozeane, die Bodenerosion und die Überlastung der Atmosphäre mit Treibhausgasen erst ermöglicht hat.^{22,23,32,38} In diesem Sinne können die natürlichen und sozialen Grenzen, an die die Menschheit gerade stößt – evolutionär gesprochen – als ein deutliches Anzeichen dafür angesehen werden, dass unsere aktuelle Lebens- und Denkweise, maladaptiv ist. Sie führt zu einer unzureichenden Anpassung an unsere „Mitwelt“, weshalb die Menschheit sich mit einem enormen Selektionsdruck konfrontiert sieht, der uns dazu zwingt, eine andere Art des Natur-, Menschheits-, Gesellschaftsverständnisses anzunehmen, wenn wir weiter auf diesem Planeten leben wollen.

Neben dieser breiten Fundamentalkritik gibt es eine weitere Stoßrichtung, die – ein Stück weit pragmatischer – ihr Hauptaugenmerk darauf legt, dass die mechanistisch-reduktionistischen Vorstellungen vom Wesen der Welt vom 17. - 20. Jahrhundert zwar äußerst nützlich waren, mittlerweile aber auch aus rein naturwissenschaftlicher und medizinischer Sicht ausgedient haben und den Erkenntnisfortschritt im 21. Jahrhundert eher behindern.^{15,39-43}

Beispiele für diese Überholtheit des Reduktionismus sind eben unter anderem, dass die Quantenphysik die Erkenntnis zu Tage gefördert hat, dass, wie der Physiker Henry Stapp feststellte, ein Elementarteilchen *„keine unabhängig existierende Entität, sondern im Wesentlichen eine Reihe von Beziehungen ist“*⁴⁴, deren Eigenschaften davon abhängen, mit welchen Methoden wir es untersuchen. Oder wie Nils Bohr es einmal ausdrückte: *Isolated material particles are abstractions, their properties being definable and observable only through their interaction with other systems“*.¹⁷

Die Entwicklungen in den Geowissenschaften und insbesondere die Erdsystemforschung zeigen – wie bereits erwähnt – auf, dass die Erde ein sich selbst stabilisierendes, anpassungsfähiges Ökosystem ist,^{10,11,45,46} in dem physikalische, chemische und biologische Prozesse so eng miteinander verzahnt sind, dass die gedankliche Trennung dieser Disziplinen wenn überhaupt, dann nur noch aus didaktischen Gründen sinnvoll sein kann. So zeigen neuere Erkenntnisse beispielsweise, dass die pflanzliche Vegetation in einem bestimmten Gebiet nicht nur passiver „Empfänger“ der dort vorherrschenden klimatischen Bedingungen ist, sondern das Klima aktiv mitgestaltet. Es hat sich etwa herausgestellt, dass Wälder durch Evapotranspiration in großem Ausmaß an der Entstehung von Wolken -und in der Folge an kontinentalem Niederschlag - beteiligt sind sowie flüchtige organische Verbindungen emittieren, welche in Form von Aerosolen Sonnenstrahlen reflektieren und so die Temperatur auf der Erde regulieren.⁴⁷⁻⁵²

Die ökologische Forschung der letzten Jahrzehnte zeigt auf, dass die „individuellen“ Organismen in einem Ökosystem viel stärker mit ihrer belebten und

unbelebten Umwelt verbunden sind als bisher angenommen. Die unterirdischen, symbiotischen Mykorrhizanetzwerke, die von den meisten Landpflanzen gebildet werden und dem intensiven, artübergreifenden Austausch von Nährstoffen und Kommunikationssignalen dienen,^{53,54} seien hier nur beispielhaft angeführt.

Die Erkenntnis, dass Bakterien durch horizontalen Gentransfer interindividuell und sogar zwischen verschiedenen Spezies ihr Erbgut austauschen und in selbstorganisierten, hochkomplexen Kolonien zusammenleben,⁵⁵ und die Tatsache, dass auch praktisch alle „höheren“ Tiere und Pflanzen für ihr Überleben auf die symbiotisch in und auf ihnen lebenden Mikroorganismen angewiesen sind,⁵⁶ zeigen, dass sich im 21. Jahrhundert nicht einmal das Konzept eines „biologischen Individuums“ oder einer klar abgrenzbaren Art mehr aufrecht erhalten lässt.^{57,58} Von Lynn Margulis wurde daher der Begriff des „Holobiont“ geprägt, welcher der allgegenwärtigen Existenz solcher Lebensgemeinschaften symbiotisch aufeinander angewiesener Organismen gerecht wird.⁵⁹ Wie problematisch die Vorstellung der Existenz biologischer „Individuen“ ist, wird weiter dadurch deutlich, dass ein beträchtlicher Teil des menschlichen Genoms (ebenso wie des Genoms wohl der meisten anderen Organismen) aus den Überbleibseln von Viren (Transposons) besteht, welche unsere VorfahrInnen im Laufe der Evolution infiziert haben und teils wichtige Körperfunktionen übernehmen. Dies impliziert eine Art des „horizontalen Gentransfers“ auch für Eukaryonten.⁶⁰⁻⁶³

Die - ebenso von Lynn Margulis stark geprägte - Endosymbiontentheorie allein beweist, wie auch die gerade genannten Forschungsergebnisse, dass in der Natur neben dem vielbetonten Konkurrenzkampf auch die Symbiose eine fundamentale evolutionäre Rolle spielt und dass Kooperation eine wichtige Überlebensstrategie darstellt, die in der bisherigen Sichtweise auf die Evolution sehr vernachlässigt wurde.⁶⁴⁻⁶⁷

Diverse Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte zeigen des Weiteren auf, dass jahrhundertlang für Menschen reservierte kognitive Eigenschaften wie „Intelligenz“, „Lernen“, „Sprache“, und „logisches Denken“ – in unterschiedlicher Ausprägung - auch bei Tieren⁶⁸⁻⁷⁴, Pflanzen^{54,75-77} und sogar Bakterien^{55,78-80} zu finden sind.

Mehr und mehr setzt sich der Ansatz durch, Kognition „bottom up“ zu denken und sie als fundamentale Eigenschaft aller Lebewesen zu begreifen, statt sie ausschließlich dem Menschen zuzuschreiben.⁸¹⁻⁸⁵

Ein aktuelles Themenheft der ältesten wissenschaftlichen Zeitschrift der englischsprachigen Welt, den „Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences“ dehnt den Begriff der Kognition noch über einzelne Lebewesen hinaus aus und unterscheidet „solid brains“ wie die aus Nervenzellen bestehenden Gehirne, von „fluid brains“, also Gehirnen die sich aus „Netzwerken ohne stabile Verbindungen und statische Elemente“ zusammensetzen.⁸⁶ Als Beispiele hierfür werden Ameisen- oder Termitenkolonien, Immunsysteme, Mikrobiome und Schleimpilze genannt.

Die kognitiven Eigenschaften dieser Netzwerke sind nicht direkt aus der Summe der „individuellen“ Ameisen/ Immunzellen/ Mikroorganismen ableitbar, sondern erwachsen als emergente Eigenschaften erst durch die Interaktion der „Individuen“.

Es sind diese emergenten Fähigkeiten, die intellektuelle Meisterleistungen wie etwa die Konstruktion von ausgefeilten Bauwerken für Millionen von Individuen, die dynamische,

lernfähige Abwehr von Krankheitserregern und die Lösung anderer komplexer Probleme ermöglichen.⁸⁶ Es ist hier das System an sich, das intelligente Handlungen hervorbringt, die weit über der kognitiven Kapazität der „einzelnen“ Akteure liegen.

Mit der Erkenntnis, dass „geistige Fähigkeiten“, „Kognition“ und „Bewusstsein“ nicht allein menschliche Eigenschaften sind, sondern einen fundamentalen Bestandteil der Natur bilden, offenbart sich eine Konvergenz zwischen den aktuellen Erkenntnissen der Kognitionsforschung und den weitreichenden Implikationen aus der Welt der Quanten, welche von den Gründervätern der Quantentheorie besonders präzise erkannt worden waren. So äußerte sich Max Planck zum Thema Materie und Bewusstsein folgendermaßen: *“I regard consciousness as fundamental. I regard matter as derivative from consciousness. We cannot get behind consciousness. Everything that we talk about, everything that we regard as existing, postulates consciousness.”*⁸⁷

Und auch Erwin Schrödinger stellte fest: *“Consciousness cannot be accounted for in physical terms. For consciousness is absolutely fundamental. It cannot be accounted for in terms of anything else.”*⁸⁷

Diese Interpretation deckt sich mit dem Verständnis zahlreicher weiterer Quantenphysiker und Kosmologen wie beispielsweise Sir James Jeans (*„the Universe begins to look more like a great thought than like a great machine.“*⁸⁸), Sir Arthur Eddington (*“It is difficult for the matter-of-fact physicist to accept the view that the substratum of everything is of mental character”*⁸⁸). Dies scheint keinesfalls eine veraltete Interpretation der Welt zu sein, da auch einige zeitgenössische Physiker zu einem ähnlichen Schluss kommen, so etwa der Princeton Professor Freeman Dyson (*„It appears that mind, as manifested by the capacity to make choices, is to some extent inherent in every electron.“*⁸⁷), der ehemalige Direktor des Max Planck Instituts für Physik Peter Dürre, Henry Stapp, John Archibald Wheeler, Andrei Linde, Fritjof Capra, uvm.^{87,89}. Der Physik- und Astronomieprofessor an der Johns-Hopkins- University Richard Conn Henry kommt in der Zeitschrift Nature zu dem Schluss: *„The Universe is entirely mental.“*⁸⁸

Lenkt man den Blick auf den Menschen und die medizinische Forschung der letzten Jahrzehnte, so ist die gemeinsame Grundaussage der Erkenntnisse aus Placeboforschung, Psychoneuroendokrinologie und Epigenetik letztlich die, dass beim Menschen chronischer Stress, persönliche Überzeugungen, die Gesellschaftsstruktur, Kindheitstraumata und sogar die Lebenserfahrungen der Vorfahren einen enormen Einfluss auf die Gentranskription, die Struktur des Gehirns, die Prävalenz diverser Erkrankungen, die Funktionsfähigkeit des Immunsystems, das Mikrobiom, den Blutdruck und vieles mehr haben.⁹⁰⁻⁹⁵ Chronobiologische Studien zeigen auf, dass menschengemachte Konzepte wie Schichtarbeit und die Zeit des Unterrichtsbegins in der Schule enorme Auswirkungen auf unsere Gesundheit haben, und dass ein Missverhältnis zwischen der sozialen Zeit und der „inneren Zeit“ das Risiko für psychische, metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht.⁹⁶⁻⁹⁸

Es ergibt sich sogar das Bild, dass die Mehrheit aller menschlichen Erkrankungen letztlich eine komplexe Pathogenese haben, die nur durch die Kombination genetischer, epigenetischer und anderer Umweltfaktoren verstanden werden kann.^{43,99,100} Daraus folgt, dass menschliche Gesundheit auch wesentlich von der Gesundheit der Umwelt abhängt.¹⁰¹

Diese Tatsache wurde uns unlängst durch den Ausbruch der SARS-CoV-2-Pandemie wieder deutlich vor Augen geführt. Schließlich lässt sich die zunehmende Prävalenz von Zoonosen in den letzten Jahrzehnten klar auf menschliche Aktivitäten wie die zunehmende Zerstörung von Ökosystemen zurückführen.^{102–104}

Daher gewinnen in jüngster Vergangenheit Konzepte wie jenes der „Planetary Health“ zunehmend an Aufmerksamkeit, weil sich die vergessene Erkenntnis neu durchsetzt, dass wir Menschen untrennbarer Teil des Ökosystems Erde sind und dass unsere Gesundheit nur dann gewährleistet ist, wenn auch unsere biotische und abiotische „Mitwelt“ gesund ist.^{21,101,105}

In jüngster Vergangenheit werden erfreulicherweise auch zunehmend soziale Faktoren wie die Ungleichheit der Vermögensverteilung, die gesellschaftlichen Machtverhältnisse und insbesondere die wichtige Rolle multinationaler Großkonzerne bei der Entstehung von Krankheiten in den Blick genommen.

Folgt man beispielsweise der Interpretation der AutorInnen der Lancet Commission on Obesity, so ist die Zunahme der Prävalenz von Übergewicht in den letzten Jahrzehnten nicht - wie bisher üblich - hinreichend durch individuelles Fehlverhalten im Sinne von Bewegungsmangel und schlechter Ernährung erklärbar. Vielmehr scheint die Ursache in unserem kapitalistischen Wirtschaftssystem und den kapitalgeprägten Machtverhältnissen in unserer Gesellschaft zu liegen.¹⁰⁶ In den Worten von Sabine Kleinert, einer der Redakteurinnen des Lancet Journals : *„Obesity is often framed as an issue of personal responsibility, such as people don't exercise enough, eat the wrong food or too much of it and current attempts to adress obesity are therefore often focused on the individual. The real problem is that we have created powerful economic systems that encourage overconsumption to the detriment of health of people and the planet“*¹⁰⁷

In der Zusammenschau all dieser physikalischen, biowissenschaftlichen, medizinischen und soziologischen Erkenntnisse, lässt sich heute mit den Worten der Wissenschaftshistorikerin E.F. Keller zumindest nüchtern konstatieren: *„The secrets of life have proven to be vastly more complex and more confusing than they had seemed in the 1960s and 70s“*.¹⁰⁸

Letztlich lassen sich also auch Lebewesen, ähnlich wie Elementarteilchen oder das System Erde, nicht ohne die vielfältigen Beziehungen definieren, die sie erst hervorbringen.^{14,78}

So ist dann auch die Einheit vormalig für getrennt gehaltener atomarer, astronomischer, geologischer, biologischer, psychischer und sozialer Sphären der Kern des naturwissenschaftlichen Paradigmenwechsels, welcher sich seit einem Jahrhundert quer durch die Naturwissenschaften von der Physik bis in die Medizin ereignet.

Ironischerweise gleichen jene durch die Naturwissenschaften im 20. und 21. Jahrhundert erlangten Erkenntnisse der Allverbundenheit und Geistigkeit der Welt mehr und mehr gerade der oft als „primitiv“ gebrandmarkten Weltsicht indigener Jäger- und Sammlerkulturen. Ähnliches trifft auf die kategorische Trennung des Menschen vom Rest der Natur zu.

Nimmt man den soeben dargestellten, fachübergreifenden Paradigmenwechsel ernst, dann lässt sich die reduktionistische Überzeugung, ein Lebewesen sei eine isolierte oder

isolierbare Maschine, deren molekulare „Bausteine“ nur gut genug verstanden werden müssen, um den Gesamtorganismus zu verstehen und Krankheiten zu heilen, schlicht nicht mehr aufrechterhalten. Das gleiche gilt zunehmend für die (ebenso metaphysischen) Grundannahmen des Materialismus und Physikalismus, wonach alles in der Welt auf Materie und ihre Interaktionen zurückführbar ist und nur das Physische als wirklich real bezeichnet werden kann.

Verbildlicht gesprochen ist unser aktueller wissenschaftlicher Standpunkt der Welterklärung vergleichbar mit der Behauptung, dass Goethes Faust einfach eine Kombination von 26 Buchstaben sei, während unser grundlegender Forschungsansatz (das Experiment) auf dem Glauben basiert, man könnte die erhabene Schönheit von Mozarts Requiem verstehen, indem man zwar auf das Hinhören verzichtet, aber dafür nach einer Analyse der Notenblätter die Häufigkeit der jeweils gespielten Töne ordentlich in einer Tabelle zusammenträgt.

So hilfreich die reduktionistische Weltsicht - beispielsweise für die Entwicklung von Maschinen, Medikamenten, Operationstechniken uvm. - auch war und weiter sein wird, zeigt sich doch recht deutlich, dass sie ausgedehnte blinde Flecken aufweist, welche nicht länger verdrängt werden können. Allen voran ignoriert diese Weltsicht die Erkenntnis, dass das Ganze mehr ist als die Summe seiner Teile und dass in einer von Verbundenheit geprägten Welt nichts wirklich isoliert betrachtet werden kann.

Aus dieser Verbundenheit ergeben sich einige interessante Implikationen nicht nur für das globale Gesundheits-, Sozial-, Politik- und Wirtschaftssystem,^{21,23,24,106,109,110} sondern eben auch für die Erforschung biologischer Systeme.

Ob auf intrazellulärer, interzellulärer, interspezifischer oder ökosystemischer Ebene; wo immer einzelne Systeme – unabhängig vom Organisationslevel – miteinander interagieren, ist das richtige Timing unabdingbare Grundvoraussetzung für eine funktionierende Kommunikation und Koordination. Ebenso stellt, wo immer sich die Präsenz biotischer Faktoren (wie symbiotische Partner, Fressfeinde, Bestäuber etc.) und abiotischer Faktoren (wie Licht, Temperatur, pH-Wert) mit einer gewissen Regelmäßigkeit ändert, die Fähigkeit, solche Veränderungen zu antizipieren und die eigene Physiologie entsprechend auszurichten, eine zentrale evolutionäre Anpassung mit Selektionsvorteil dar.¹¹¹

Das hochvernetzte Ökosystem Erde dreht sich bekanntlich mit einer Periode von etwa 24 Stunden um seine eigene Achse und einer Periode von 365 Tagen um die Sonne, während gleichzeitig durch die Einwirkungen der Gravitation von Mond und Sonne Gezeitenkräfte mit unterschiedlicher Periode für veränderte Umweltbedingungen sorgen. Daher existieren für die meisten Lebewesen sowohl eine Vielzahl von kommunikativen und kooperativen Verbindungen zu anderen Organismen, als auch regelmäßig wiederkehrende Schwankungen von physikalischen, chemischen und biologischen Umgebungsbedingungen. So ist es kaum verwunderlich, dass der überwältigende Großteil aller untersuchten Pro- und Eukaryoten im Laufe Ihrer Evolutionsgeschichte eine Möglichkeit gefunden hat, ihre Physiologie mit anderen Lebewesen und regelmäßigen Schwankungen ihrer Umwelt zu synchronisieren: circadiane, ciraclunare und circannuale Uhren.¹¹²

1.2 Das circadiane System

1.2.1 Vorkommen, Eigenschaften und molekularer Aufbau circadianer Uhren

Wie bereits erwähnt, ist jedes Lebewesen auf dem Planeten Erde in ein Ökosystem aus anderen Lebewesen sowie abiotischen Faktoren eingebunden. In den allermeisten dieser Ökosystemen kommt es zu regelmäßig wiederkehrenden Schwankungen von Umgebungsfaktoren, die für die Überlebensfähigkeit der Organismen von größter Relevanz sind.¹¹³ So existiert auf der Erde beispielsweise ein Tag-Nacht-Rhythmus, woraus sich nicht nur regelmäßige Schwankungen in der Lichtmenge, sondern etwa auch der Umgebungstemperatur ergeben. Ebenso regelmäßig – wenn auch mit anderer Periode – kommt es in zahlreichen Küstenregionen zum Phänomen der Gezeiten, wodurch sich der dortige Lebensraum radikal verändert. Darüber hinaus existieren abseits vom Äquator die Jahreszeiten, welche große Unterschiede in der Durchschnittstemperatur, der Niederschlagsmenge etc. verursachen. Die meisten der eben genannten regelmäßig wiederkehrenden Veränderungen führen auch zu enormen Schwankungen im Vorhandensein von verfügbarer Licht- oder Wärmeenergie sowie von Nahrung, Symbiosepartnern, Fressfeinden usw.

Daher besteht für die meisten bekannten Organismen auf der Erde ein enormer Selektionsdruck, diese regelmäßigen Veränderungen zu antizipieren und beispielsweise den eigenen Stoffwechsel sowie den Grad an Aktivität an sie anzupassen.

Gewährleistet wird diese Fähigkeit durch innere Uhren auf zellulärer Ebene, welche eine Periode von etwa 12,5 Stunden, 24 Stunden, 28 Tagen bzw. einem Jahr (lat. circa diem) aufweisen und daher auch als circatidale, circadiane, circalunare bzw. circannuale Uhren bezeichnet⁹⁸ werden. Die am besten erforschte und für die vorliegende Arbeit relevanteste Variante eben genannter innerer Uhren ist die circadiane Uhr, weshalb im Folgenden nur noch von dieser die Rede sein wird.

Die Existenz einer circadianen Uhr konnte sowohl in einigen Prokaryoten als auch in unzähligen Eukaryoten nachgewiesen werden. So exprimieren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* ihre photosynthetischen Enzyme mit einer Periode von 24 Stunden, der Pilz *Neurospora crassa* bildet seine Sporen mit ähnlicher Regelmäßigkeit und das Cyanobacterium *Synechococcus* nutzt seine circadiane Uhr, um die Prozesse der Photosynthese und der Stickstofffixierung zum optimalen Zeitpunkt auszuführen. Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* orientiert die Zeit des Schlüpfens, der Nahrungssuche und der Fortpflanzung an der inneren Uhr und auch die Aktivität von Säugetieren, wie etwa dem Goldhamster, erfolgt mit circadianer Rhythmizität.^{112,114}

Die zentralen Charakteristika innerer Uhren wurden erstmals von Colin Pittendrigh beschrieben und lauten (Eigene Übersetzung des englischen Originals):¹¹⁵

- „Circadiane Uhren sind selbsttragend in dem Sinne, dass sie auch unter konstanten Umweltbedingungen eine Periode von etwa 24 h aufrechterhalten
- Circadiane Uhren sind temperaturkompensiert, weisen also in ihrer Periode - anders als die meisten biochemischen Reaktionen - nur eine geringe

Temperaturabhängigkeit auf

- Circadiane Uhren reagieren sensibel auf rhythmische Umweltveränderungen in Form von Licht und Temperatur und können sich in einem begrenzten Bereich mit diesen externen, als „Zeitgeber“ bezeichneten Rhythmen synchronisieren. Dieser Prozess wird „Entrainment“ (Phasenkopplung) genannt.“

Auch bei komplexen Eukaryoten wie Menschen ist eine innere Uhr mit solcherlei Merkmalen nicht nur auf der Ebene des Gesamtorganismus, sondern in praktisch jeder Zelle des Körpers nachweisbar.

Erste Hinweise darauf, dass circadianer Rhythmen eine genetische Basis haben, fanden sich bereits in Kreuzungsexperimenten aus dem Jahre 1932.¹¹⁶ Seit schließlich, dank der Pionierarbeiten von Konopka und Benzer im Jahre 1972, das erste Uhr-Gen „Period“ der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* isoliert worden war, konnte die genetische Basis der circadianen Rhythmen tiefergehend aufgeklärt werden.¹¹⁷

Heute wird vermutet, dass der Oszillator – also das Herzstück des „zellulären Uhrwerks“ – aus wenigen Uhrgenen besteht, deren Expression rhythmisch erfolgt und durch äußere Zeitgeber beeinflusst werden kann. Einige dieser Proteine wirken wiederum als Transkriptionsfaktoren für eine Vielzahl weiterer Gene und ermöglichen so die rhythmische Expression von großen Teilen des Genoms („uhrenkontrollierte Gene“).

Bei der Untersuchung verschiedenster Modellorganismen kristallisierte sich als zentraler Mechanismus des „zellulären Uhrwerks“ eine Translations-Transkriptions-Rückkopplung oder kurz TTR (englisch translation-transcription feedback loop (TTFL)) zwischen den Uhrgenen/Uhrproteinen heraus.¹¹⁸

Obwohl die an dieser Maschinerie beteiligten Proteine zwischen den verschiedenen Reichen der Lebewesen ähnliche Funktionen erfüllen, weisen sie nur eine geringe Ähnlichkeit in der Sequenz auf, was auf eine weitgehend unabhängige Evolutionsgeschichte derselben hindeutet.¹¹⁹

In dieser Arbeit soll exemplarisch das vereinfachte Modell der TTR menschlicher Zellen herausgegriffen und näher erläutert werden. Hierzu seien die beteiligten Gene und Genprodukte zunächst in transkriptionale Aktivatoren und transkriptionale Repressoren unterschieden.

Die transkriptionalen Aktivatorproteine BMAL1 und CLOCK formen ein Heterodimer, welches die Transkription einer Vielzahl von Genen fördert. Unter diesen befinden sich auch die Repressoren PER1/2/3 und CRY1/2. Ihre Genprodukte akkumulieren im Zytosol und bilden ebenfalls ein Heterodimer, welches im Zellkern wiederum die Transkription von BMAL1 und CLOCK zu hemmen vermag. Die Periode dieser Rückkopplungssequenz beträgt etwa 24 Stunden.¹²⁰ BMAL1, CLOCK, PER1/2/3 und CRY1/2 stellen damit den Oszillator des „zellulären Uhrwerks“ dar.

Diese basale TTR wird durch weitere Einflussfaktoren wie die BMAL-CLOCK abhängigen Aktivatoren Rev-erb-a sowie durch posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen durch Kinasen (unter anderem CK1 ϵ und CK1 δ), beeinflusst und unterliegt so einer komplexen Feinjustierung.¹²⁰

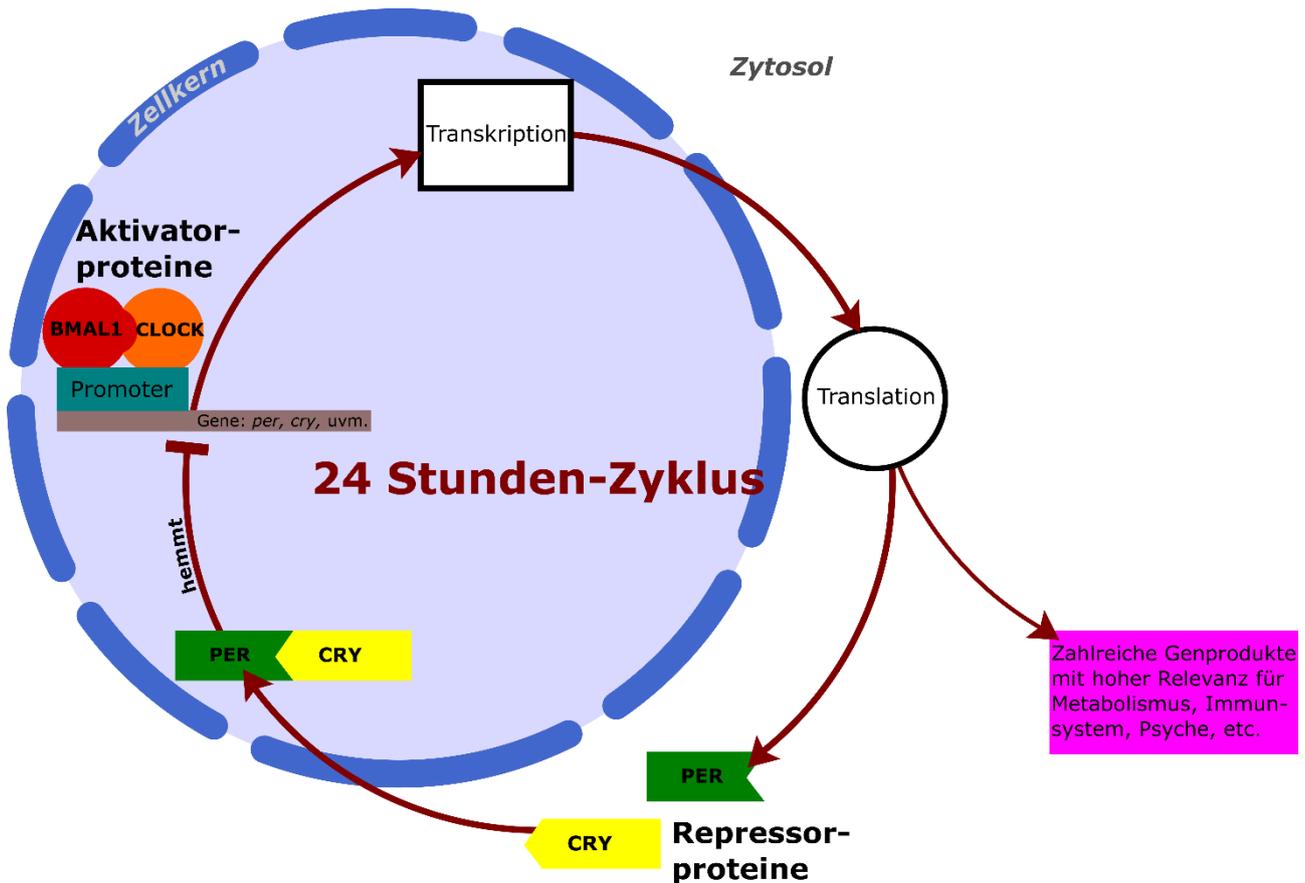


Abbildung 1: Die Transkriptions-Translations-Rückkopplung in stark vereinfachter Form. Die Aktivatorproteine BMAL1 und CLOCK fördern die Transkription zum einen von uhrabhängigen Genen zur Regulation des Organismus (pinker Kasten) und zum anderen von Repressorgenen (wie per und cry). Die Repressorproteine PER und CRY akkumulieren nach ihrer Biosynthese im Zytosol und hemmen nach Dimerisierung und Transport in den Zellkern die Aktivität der Aktivatorproteine und damit auch ihre eigene Transkription. Ein Zyklus von der Transkription bis zur Hemmung der Transkription dauert etwa 24 Stunden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten durch andere Proteine sowie Phosphorylierungen verzichtet.

Ogleich bezüglich der zentralen Rolle solcher Transkriptions-Translations-Rückkoppelungen für die circadianen Rhythmen biologischer Systeme ein weitgehender Konsens besteht, wurde ihr Status als primärer zellulärer Oszillator durch neuere Forschungsarbeiten in Frage gestellt. So konnte gezeigt werden, dass die Kombination von nur drei cyanobakteriellen Proteinen mit ATP in vitro zu einem Phosphorylierungsmuster mit 24-stündiger Periode führt, welches alle Charakteristika eines endogenen Oszillators aufweist.¹²¹ Weiters wurden an Modellorganismen unterschiedlicher Domänen circadiane Veränderungen im Oxidationsstatus von antioxidativen Enzymen (Peroxiredoxinen) nachgewiesen, welche unabhängig von der TTR erfolgen.¹²²

Beide Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der molekulargenetische „Uroszillator“ circadianer Rhythmität komplexer ist als bisher gedacht und auch

weiterhin von großem Forschungsinteresse sein wird.

Noch komplexer als das „genetisch-biologische Uhrwerk“ einer einzelnen Zelle, ist die Synchronisation der in die Billionen gehenden zellulären Uhren in einem komplexen Organismus.

1.2.2 Die Synchronisation der zellulären circadianen Uhren in einem mehrzelligen Organismus

Viele Körperfunktionen eines komplexen, mehrzelligen Organismus wie dem Menschen unterliegen rhythmischen Veränderungen. Am offensichtlichsten ist sicherlich die Rhythmizität des Wechsels zwischen Wach- und Schlafphasen des Menschen. Doch viele weitere Parameter, wie etwa die Körpertemperatur, der Cortisolspiegel, der Blutglucosespiegel, die Einwanderungskinetik von Immunzellen und auch komplexe Funktionen wie die kognitive Leistungsfähigkeit, sind durch regelmäßig wiederkehrende Schwankungen mit einer Periode von 24 Stunden gekennzeichnet.^{123–126} Untersuchungen der Transkriptome verschiedener Mausorgane zeigten gar, dass 43% aller für Proteine codierender Gene der Maus an irgendeiner Stelle im Mäusekörper mit einer circadianen Rhythmik exprimiert werden, wobei die rhythmische Expression in aller Regel organspezifisch erfolgt.¹²⁷

Es liegt auf der Hand, dass all die vielfältigen Körperfunktionen von Eukaryoten einer Koordination der beteiligten Organsysteme bedürfen. Hinzu kommt, dass diese Körperfunktionen auf Rhythmen der Außenwelt abgestimmt sein müssen.

Das circadiane System von Säugetieren, welches diese Koordination leistet, besteht letztlich aus einem komplexen Netzwerk verschiedener Oszillatoren in unterschiedlichen Organen, die über multiple Rückkopplungsmechanismen miteinander in Verbindung stehen, aber jeweils einen unterschiedlich großen Einfluss auf das Gesamtsystem haben.¹⁷ Dominantester Taktgeber in diesem Netzwerk ist der im ventralen Hypothalamus lokalisierte Nucleus Suprachiasmaticus (englisch: suprachiasmatic nuclei oder SCN).¹²⁸ Die zentrale Bedeutung dieses Hirnareals für die Synchronisation circadianer Rhythmen bei Säugetieren konnte durch Läsions- und Transplantationsexperimente an Nagetieren gezeigt werden.^{129,130}

Das über dem Chiasma opticum liegende und paarig vorhandene Kerngebiet des SCN besteht aus etwa 20.000 Neuronen, von denen eine Subpopulation über den retinohypothalamischen Trakt photische Informationen aus der Außenwelt erhält. Dazu sind spezialisierte, retinale Ganglienzellen nötig, welche das Lichtrezeptorprotein Melanopsin exprimieren und durch Lichteinstrahlung in ihrer Aktivität reguliert werden. Über primär glutamaterge Synapsen wird diese Information an Teile des SCN weitergeleitet, was dort eine Veränderung des Expressionsmusters von Per1 und Per2 - und damit eine Phasenverschiebung in den entsprechenden Neuronen - zur Folge hat.^{131,132} Auch nonphotische Signale aus anderen Hirnregionen, wie den Raphekernen sowie indirekt photische Signale aus dem Corpus geniculatum laterale vermögen über synaptische Verbindungen eine Phasenverschiebung der innervierten SCN-Neuronen auszulösen, was die Beeinflussung des zentralen Taktgebers unter anderem durch körperliche Aktivität und

Erregung impliziert.¹²⁸

Im SCN selbst erfolgt schließlich die Integration dieser Signale, wobei die einzelnen Neurone dieses Kerngebiets eine außergewöhnlich starke Kopplung miteinander aufweisen, sodass eine Perioden- und Phasenverschiebung in einer Subpopulation sich zügig auf die Phasen und Perioden anderer SCN-Neurone auswirkt. Grundlage dieser Kopplung scheinen sowohl umfangreiche synaptische Verknüpfungen als auch Gap Junctions zu sein.

¹³³

Die koordinierten SCN-Neurone stehen über direkte neuronale Verbindungen sowie über parakrin sezernierte Signalstoffe mit anderen Hirnbereichen in Verbindung. Besonders stark vom SCN innerviert werden dabei hypothalamische Gebiete, wie die subparaventriculäre Zone und das präoptische Areal, sowie der Nucleus striae terminalis und Kerne des lateralen Septums, von wo aus das Synchronisierungssignal an den Rest des Körpers weitergeleitet wird.¹²⁸

Die Synchronisation dieser peripheren Oszillatoren findet letztlich vor allem über vier Mechanismen statt:¹³⁴

- Rhythmische neuronale Signaltransduktion durch die Innervation von Zielorganen wie Speicheldrüsen, Leber und Nebennieren über sympathische und parasymphatische Fasern.
- Rhythmische Ausschüttung von Hormonen, insbesondere der CRH/ACTH/Glukokortikoid-Achse.
- Rhythmizität des Aktivitäts-/Schlafverhaltens und der Nahrungsmittelzufuhr.
- Rhythmische Schwankungen der Körperkerntemperatur.

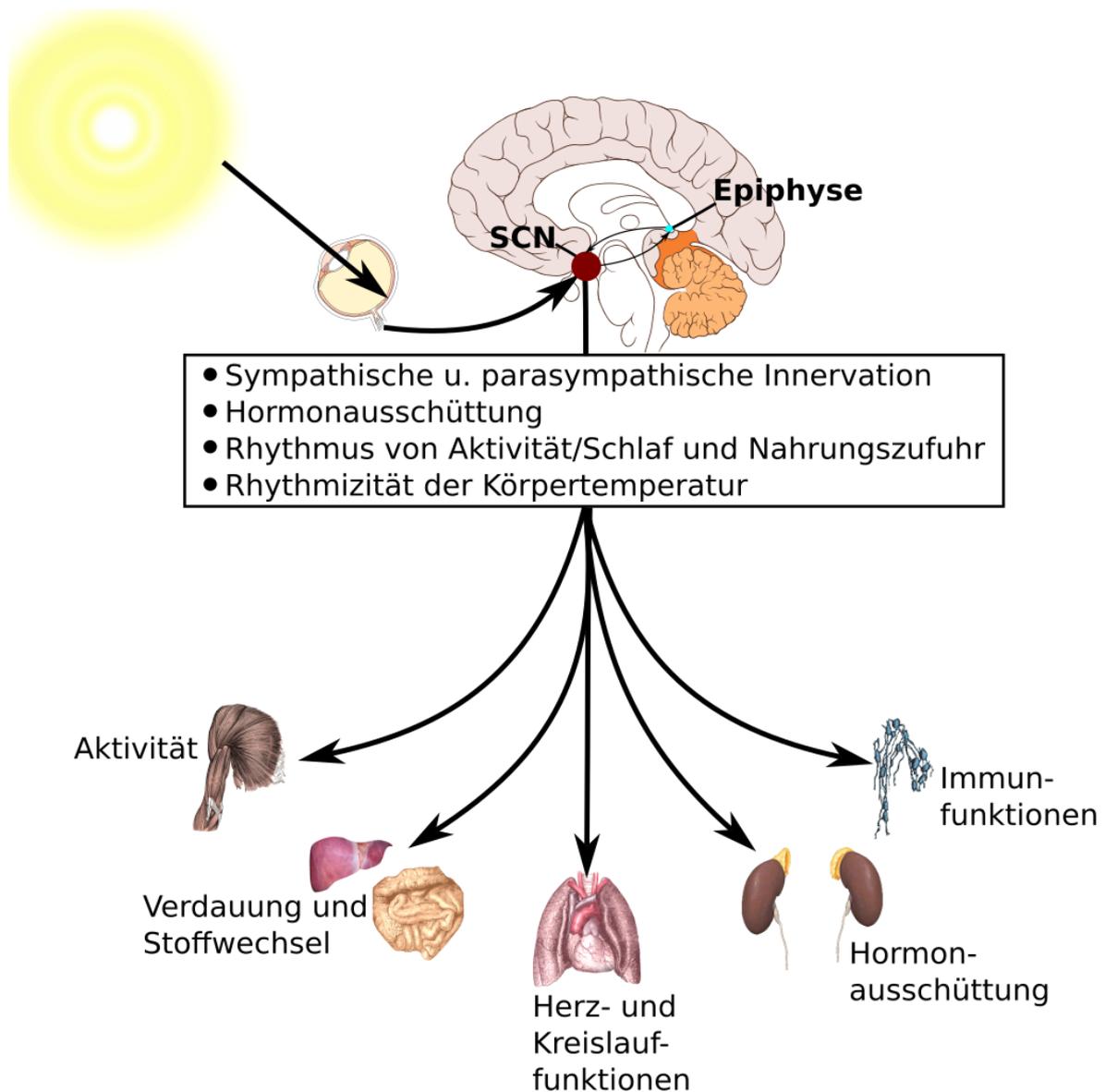


Abbildung 2: Das circadiane System des Menschen schematisch dargestellt. Rhythmische Außenreize wie der Hell-Dunkel-Zyklus werden über spezielle retinale Ganglienzellen an den Nucleus suprachiasmaticus (SCN) weitergeleitet, welcher über die in der Abbildung beschriebenen Output-Wege die peripheren circadianen Uhren miteinander synchronisiert. Abbildungen lizenzfrei über Public Domain, Grundkonzept beschrieben in: Van Drunen R, Eckel-Mahan K. Circadian Rhythms of the Hypothalamus: From Function to Physiology. *Clocks Sleep*. 2021 Feb 25;3(1):189-226. doi: 10.3390/clockssleep3010012.

Es lassen sich sich große Unterschiede in der Sensitivität der Zellen gegenüber den verschiedenen Signalen feststellen. So ist der Einfluss von rhythmischer Nahrungszufuhr auf die Phase der Gen- und Proteinexpression von Leberzellen deutlich größer als auf andere Organe, sodass es in der Leber von Mäusen allein durch veränderte Fütterungszeiten zu einer Entkopplung der Phase von jener des Nucleus suprachiasmaticus kommen kann.¹³⁵ Einen besonders starken Reiz zur Synchronisation verschiedenster peripherer Oszillatoren stellt der Temperaturzyklus dar.¹³⁶ Die Körperkerntemperatur unterliegt bei Säugetieren der

Steuerung des Hypothalamus und weist einen robusten circadianen Rhythmus auf.¹³⁷ Durch diesen Rhythmus werden – möglicherweise über die Expression von Proteinen der Heat-Shock-Factor-Familie (HSF) – peripher gelegene Oszillatoren untereinander und mit dem SCN synchronisiert.^{134,136,138}

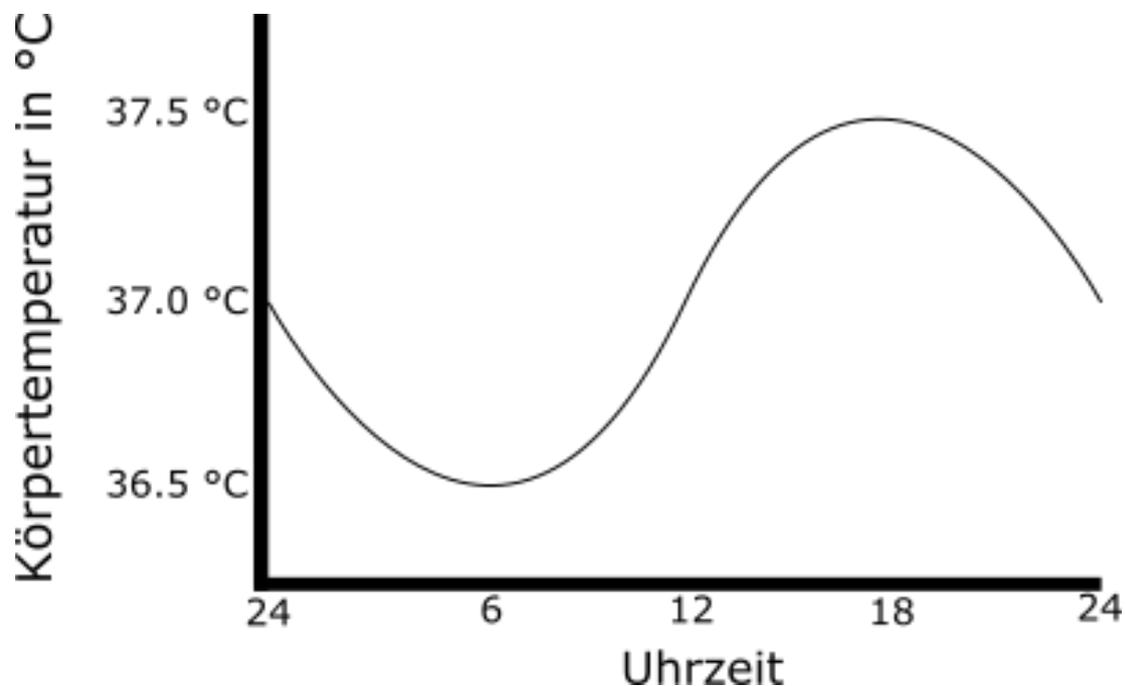


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des 24-Stunden-Rhythmus der Körpertemperatur des Menschen. Abgezeichnet von: Edwards, Ben & Reilly, Thomas & Waterhouse, Jim. (2009). *Zeitgeber-effects of exercise on human circadian rhythms: What are alternative approaches to investigating the existence of a phase-response curve to exercise?*. *BIOL RHYTHM RES.* 40. 53-69. 10.1080/09291010802067072.

1.3 Die Relevanz der circadianen Uhr für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Erkrankungen

Die Tatsache, dass zahlreiche Körperfunktionen wie der Blutdruck, die Cortisolspiegel, die kognitive Leistungsfähigkeit und vieles mehr regelmäßigen, circadianen Schwankungen unterliegen, weist bereits darauf hin, dass ungestörte circadiane Rhythmen für die menschliche Gesundheit eine wichtige Rolle spielen. So zeigen auch Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte, dass Störungen circadianer Rhythmen an der Pathogenese und Aufrechterhaltung einer Vielzahl von Erkrankungen wie etwa metabolischen Störungen, Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen, psychischen Erkrankungen und vielen weiteren mehr beteiligt sind.¹³⁹⁻¹⁴¹

Erkenntnisse, wie etwa die Tatsache, dass mehr als die Hälfte der umsatzstärksten Medikamente in den USA (u.a. etwa Aspirin, Omeprazol, Insulin lispro) auf Proteine wirken, deren Gene in Mäusen circadian exprimiert werden¹²⁷ und dass die Inzidenz von

Herzinfarkten und Schlaganfällen circadianen Schwankungen unterliegt,¹⁴² machen deutlich, dass das Timing in Überlegungen zur Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik und Therapie von Erkrankungen stärker einbezogen werden sollte und einen vielversprechenden Forschungsbereich darstellt. Im Fokus für solche Forschung könnten insbesondere Erkrankungen stehen, deren Ursache durch eine rein reduktionistische Herangehensweise bisher nicht ausreichend geklärt werden konnte, wie etwa metabolische Störungen sowie Autoimmun- oder neurodegenerative Erkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem Zusammenhang zwischen Störungen des circadianen Systems sowie der Entstehung und Aufrechterhaltung neurodegenerativer Erkrankungen. Im Anschluss an eine Skizzierung von Gemeinsamkeiten in der komplexen Pathogenese dieser Krankheiten soll zunächst auf die Relevanz von Störungen des circadianen Systems für die Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung neurodegenerativer Erkrankungen eingegangen werden.

Trotz der großen Fortschritte, die in den vergangenen Jahrzehnten bei der Erforschung der Funktionsweise circadianer Uhren und der interzellulären Synchronisation erzielt werden konnten, bestehen noch große Wissenslücken, beispielsweise bei der Erforschung der Bedeutung des circadianen Systems für die koordinativen und kommunikativen Leistungen ganzer Ökosysteme.

1.4 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind Krankheiten, bei denen Nervenzellen in zunehmendem Maße dysfunktional werden und zugrunde gehen. Typischerweise treten diese Störungen erst im höheren Lebensalter auf, weshalb das Alter als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung einer neurodegenerativen Erkrankung gilt.¹⁴³ So wird geschätzt, dass die jährliche Inzidenzrate der Alzheimerdemenz für 65-70-Jährige etwa 0,5% beträgt, während sie für über 85-Jährige bei 6-8 % liegt. Insbesondere in Gesellschaften mit hoher Lebenserwartung ist daher eine steigende Inzidenz und Prävalenz dieser Erkrankungen zu verzeichnen, welche häufig mit einem hohen Leidensdruck der PatientInnen und der Angehörigen einhergehen.¹⁴³

Je nach Pathophysiologie und betroffener Hirnregion kommt es bei den verschiedenen Erkrankungen zu unterschiedlichen Symptomen, weshalb die Krankheitsklassifikation derzeit primär nach zwei Kriterien vorgenommen wird:¹⁴⁴

- dem klinischen Erscheinungsbild der PatientInnen (wie etwa Gedächtnisstörungen, Störungen des Sozialverhaltens oder Bewegungsstörungen), welches auf den zunehmenden Ausfall bestimmter Hirnregionen zurückgeht.
- dem neuropathologischen Nachweis von unterschiedlichen, biochemisch veränderten und intra- bzw. extrazellulär akkumulierten Proteinen, oft in Form von Aggregaten.

Aus derartigen klinischen und neuropathologischen Veränderungen ergibt sich die aktuelle

Differenzierung und Klassifikation der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen wie folgt (nach Prävalenz absteigend geordnet): ¹⁴⁴⁻¹⁴⁷

Tabelle 1: Klassifikation der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen

Name der Erkrankung	Primäre klinische Auffälligkeiten	Primär betroffene Hirnregionen	Primäre neuropathologische Auffälligkeiten
Morbus Alzheimer	Gedächtnisstörungen, Störungen kognitiver Funktionen	Basales Vorderhirn, Frontal- und Temporallappen, Limbisches System	Akkumulation von fehlgefaltetem Amyloid β (extrazellulär) und tau (intrazellulär)
Morbus Parkinson und andere Synucleinopathien / Lewy Body Demenzen	Bewegungsstörungen (insb. Tremor, Akinese, Rigor), visuelle Halluzinationen, kognitive Fluktuationen	Substantia nigra, Amygdala, Hirnrinde	Intrazelluläre Akkumulation von α -Synuclein in Form sogenannter Lewy-Bodies
Frontotemporale Demenzen	Verhaltensauffälligkeiten (z.B. mangelnde Impulskontrolle) und Veränderungen der Persönlichkeit, Aphasie	Frontal- und Temporallappen, Basalganglien	Intrazelluläre Akkumulation von fehlgefaltetem Tau-Protein, TDP-43, Ubiquitin und FUS
Chorea Huntington	Choreatiforme Bewegungsstörungen (insb. Hyperkinesie), Verhaltens- und Affektstörungen	Basalganglien (insb. Putamen)	Verändertes Huntingtin-Protein aufgrund eines Trinukleotidrepeats im Gen für Huntingtin

Obwohl diese Kriterien oft eine Namensgebung und gewisse Einteilung der Erkrankungen erlauben, so sind sie doch weitgehend deskriptiv und können keine Aussage über die pathophysiologischen Grundlagen treffen. Darüber hinaus hat die häufig vorgebrachte Hypothese von pathologisch modifizierten und akkumulierten Proteinen als primärem Krankheitsmechanismus neurodegenerativer Erkrankungen, mit gewissen Inkonsistenzen zu kämpfen. So besteht beispielsweise zwischen der Menge an Amyloidplaques beim Morbus Alzheimer und der klinischen Schweregrad der Demenz keine Korrelation. ^{146,148} Darüber hinaus gewann in den letzten Jahrzehnten die „toxic oligomer hypothesis“ an Zulauf, wonach die mikroskopisch sichtbaren Aggregate eher einen Schutzmechanismus darstellen. Für die Schädigung der Nervenzellen wären demnach vor allem die löslichen

toxischen Oligomere (wie etwa A β und α -Synuclein) verantwortlich und nicht die akkumulierenden Plaques.¹⁴⁹

Außerdem sieht sich das aktuelle Klassifikationssystem mit einer nicht unerheblichen diagnostischen Unschärfe konfrontiert, da sowohl die klinische Symptomatik als auch die Proteinopathien zwischen den einzelnen Krankheitsbildern – insbesondere in späteren Stadien – stark überlappen.^{150–152} So fanden sich in einer Studie an PatientInnen, welche an Synucleinopathien erkrankt waren, in 77% der Fälle zusätzlich neuropathologische Anzeichen für eine Alzheimer-Demenz in Form von Tau-Fibrillen und β -Amyloidplaques,¹⁵³ während in einer anderen Studie in 57 % der PatientInnen mit Alzheimer-Demenz auch pathologische TDP-43-Inklusionen festgestellt werden konnten.¹⁵⁴

Noch problematischer als die diagnostische Unschärfe sind jedoch die ausbleibenden Erfolge in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. Seit über einhundert Jahren werden Erkrankungen wie etwa die Alzheimerdemenz bereits erforscht.^{155,156} Auf Basis der „ein fehlgefalteter Proteintyp führt zu einer Erkrankung“- Hypothese wurden große Forschungsbemühungen unternommen, um die genetischen und molekularbiologischen Grundlagen neurodegenerativer Erkrankungen aufzuklären und Medikamente zu entwickeln.^{157–159} Nicht erst seit der „Dekade des Gehirns“ in den Neunzigerjahren werden regelmäßig optimistische Verheißungen öffentlichkeitswirksam verbreitet. So verkündeten elf „führende“ NeurowissenschaftlerInnen im Jahr 2004 voller Zuversicht: *„Vor allem was die konkreten Anwendungen angeht, stehen uns in den nächsten zehn Jahren enorme Fortschritte ins Haus. Wahrscheinlich werden wir die wichtigsten molekularbiologischen und genetischen Grundlagen neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson verstehen und diese Leiden schneller erkennen, vielleicht von vornherein verhindern oder zumindest wesentlich besser behandeln können.“*¹⁶⁰

Jedoch: „enorme Fortschritte“ in der Prävention, Diagnostik und Therapie neurodegenerativer Erkrankungen sind in den vergangenen Jahrzehnten leider weitgehend ausgeblieben. So ist es nur in Ausnahmefällen wie etwa dem Morbus Parkinson gelungen, mit dem Einsatz von L-Dopa eine Therapie zu entwickeln, welche - zumindest zeitweise - die Krankheitssymptome lindern kann, ohne dass dabei allerdings die Progression der Erkrankung an sich verlangsamt oder gar verhindert werden kann. Diese Therapieoption besteht jedoch bereits seit 1961 und kann daher nur schwerlich als Beleg für den Erfolg des aktuellen neurowissenschaftlichen Paradigmas gewertet werden.

Die therapeutischen Möglichkeiten bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie etwa der Alzheimer-Demenz, der Frontotemporalen Demenzen oder Chorea Huntington, sind noch weitaus unbefriedigender. Bei der häufigsten Demenzform, der Alzheimer-Demenz stehen beispielsweise aktuell nur palliative Medikamente mit geringer Effektivität zur Verfügung.¹⁶¹

Ogleich fehlgefaltete und akkumulierte Proteine für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle spielen, lässt sich doch zunehmend beobachten, dass die reduktionistische, ausschließlich auf einzelne fehlgefaltete Proteine gerichtete, Sichtweise verlassen wird und einer Perspektive weicht, welche neurode-

generative Erkrankungen als multikausale Systemerkrankungen charakterisiert. Demzufolge sind neurodegenerative Erkrankungen das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zahlreicher, sich gegenseitig modulierender zellulärer Funktionen^{99,158,159,161-165}, welche ihrerseits auch durch das Alter, soziale Faktoren, Persönlichkeitsmerkmale und den Lebensstil mitbeeinflusst werden.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹

Die zellulären Funktionen, welche in der Literatur am häufigsten als krankheitsfördernd genannt werden, sind die Folgenden:

- Störungen der Proteinhomöostase mit Akkumulation pathologischer Aggregate
- Oxidativer Stress
- Mitochondriale Dysfunktionen
- Neuroinflammation
- metabolische Störungen
- Störungen des intrazellulären Transports

All diese Faktoren interagieren im menschlichen Organismus dynamisch miteinander und beeinflussen sich gegenseitig.¹⁷⁰⁻¹⁷² So können metabolische Veränderungen über Citratzyklus und Atmungskette eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion zur Folge haben, welche wiederum die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bedingt. Oxidativer Stress scheint hierbei ein besonders zentraler Faktor zu sein, welcher sowohl zur Fehlfaltung von (Transport-)Proteinen als auch zur Zellnekrose – und damit dem Einwandern von Immunzellen und dem Auslösen einer Entzündungsreaktion - führt. Die Entzündung beeinflusst wiederum die lokale metabolische Aktivität und induziert unter anderem die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch sie weiter zur Proteinaggregation beiträgt.¹⁷⁰⁻¹⁷²

Letztlich ergibt sich also das Bild, dass neurodegenerative Erkrankungen heute als komplexe Systemerkrankungen verstanden werden^{162,165,173}, also gewissermaßen als emergente Entitäten, die aus einer Störung der oben genannten fundamentalen zellulären Funktionen und ihrer Interaktionen hervorgehen.

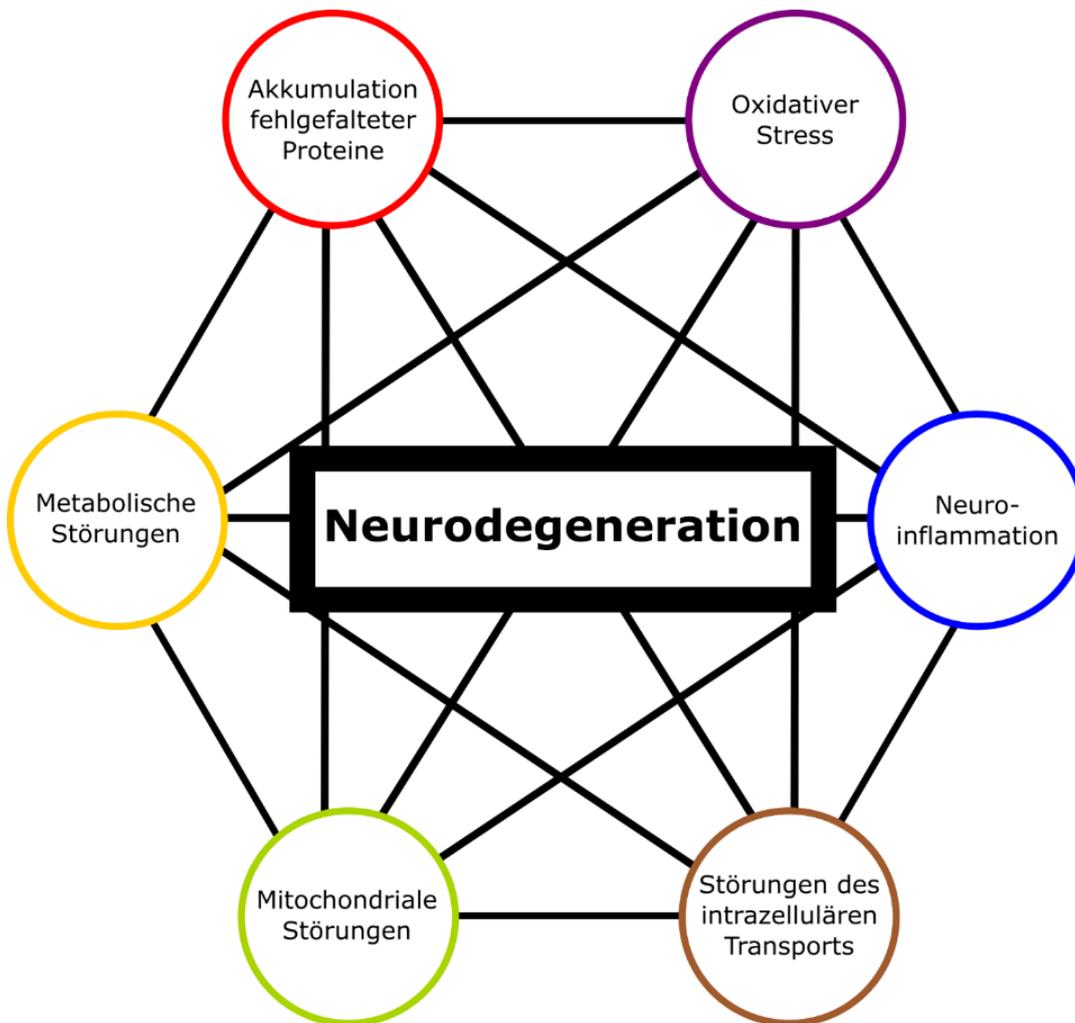


Abbildung 4: Neurodegeneration als Systemerkrankung

Als gemeinsame Ursache dieser zellulären Störungen gerät zunehmend ein Zustand der chronischen Entzündung („chronic inflammation“) in den Fokus. Demnach führen Lebensumstände, die eng mit unserer aktuellen Lebensweise verbunden sind, wie etwa mangelhafte Ernährung und unzureichende körperliche Aktivität, chronischer psychosozialer Stress, Veränderungen des Mikrobioms („Dysbiose“), Umwelt- und Industriegifte, chronische Infektionen und nicht zuletzt auch Störungen der circadianen Rhythmik zu einem Zustand dauerhafter systemischer Entzündung („low-grade systemic chronic inflammation“¹⁷⁴). Diese chronische Entzündungsreaktion wiederum begünstigt dieser Theorie zufolge dann die Entstehung aktueller „Volkskrankheiten“ wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Metabolisches Syndrom, Typ II- Diabetes, Autoimmunerkrankungen, Osteoporose, einige Krebsformen, Depression und eben auch neurodegenerative Erkrankungen. ^{99,171,174–178}

1.5 Die Rolle circadianer Dysfunktionen für die Entstehung und Aufrechterhaltung neurodegenerativer Erkrankungen

Unter Beachtung der Tatsache, dass all die bei neurodegenerativen Erkrankungen geschädigten Funktionen in einem komplexen Organismus nicht nur örtlich, sondern auch zeitlich koordiniert ablaufen müssen, überrascht es nicht, dass alle oben genannten Funktionen von circadianen Uhren beeinflusst werden und Störungen der circadianen Rhythmik in unterschiedlichen Organen/Organsystemen auch zu Störungen der Immunreaktion^{179,180}, der mitochondrialen Funktion^{181,182}, des Metabolismus¹⁸³⁻¹⁸⁶, des intrazellulären Transports¹⁸⁷, der Protein-Homöostase^{188,189} und der ROS-Homöostase^{122,190,191} führen können.

Entsprechend häufen sich auch die Belege für einen kausalen Zusammenhang zwischen Störungen circadianer Rhythmen und der Pathogenese und Aufrechterhaltung neurodegenerativer Erkrankungen.¹⁹²⁻¹⁹⁵

So zeigt sich in Beobachtungsstudien an Menschen, dass es bei Alzheimer-PatientInnen teilweise bereits vor dem Auftreten typischer kognitiver Symptome zu Störungen circadianer Rhythmen kommt^{196,197} sowie, dass das Erkrankungsrisiko bei PatientInnen mit gestörten circadianen Rhythmen erhöht ist und der kognitive Verfall in diesem PatientInnenkollektiv schneller fortschreitet.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Bei PatientInnen mit bereits diagnostizierten neurodegenerativen Erkrankungen, treten dann auch häufig – im Vergleich zu gleichaltrigen Gesunden – übermäßig starke Störungen circadianer Rhythmen auf.^{201,202} Vergleichbare Auffälligkeiten lassen sich auch im Mausmodell nachvollziehen.²⁰³⁻²⁰⁵

Die Mechanismen dieses Einflusses sind noch nicht annähernd aufgeklärt. Allerdings konnte in korrelativen Studien gezeigt werden, dass Schlafmangel bei Menschen zu einer Erhöhung neuroinflammatorischer Marker im Liquor führen kann und einen Einfluss auf die Amyloid- β -Kinetik hat.^{206,207} Auf genetischer Ebene wurde festgestellt, dass Single-Nucleotide Polymorphismen (SNP) in zentralen Genen der inneren Uhr (wie etwa CLOCK, BMAL1 und PER1) mit einem erhöhten Risiko für Morbus Alzheimer bzw. Parkinson einhergehen²⁰⁸⁻²¹⁰ und im Mausmodell wird durch Schlafmangel nicht nur die Akkumulation von Amyloid- β und tau erhöht²¹¹, sondern auch die Protein-Homöostase gestört und Neuroinflammation begünstigt.^{212,213}

Auch die Phosphorylierung synaptischer Proteine, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der synaptischen Funktion spielt, unterliegt physiologischerweise circadianen Schwankungen. Durch Schlafentzug kann die Rhythmizität der Proteinphosphorylierung – welche Feedback- und Regulationsmechanismen letztlich kausal zu den o.g. korrelativen Veränderungen und Krankheitssymptomen führen ist weitgehend unbekannt, es gibt allerdings einige Hinweise darauf, dass die zahlreichen, auf verschiedenen Ebenen vorhandenen Verbindungen zwischen circadianen Rhythmen und der Homöostase reaktiver Sauerstoffspezies in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen eine vorrangige Rolle spielen.^{122,190-192,215}

Das circadiane System spielt zum einen für die Koordination des oxidativen Nährstoffkatabolismus eine zentrale Rolle¹⁸⁴⁻¹⁸⁶, etwa indem es die mitochondriale Aktivität und ATP-Produktion reguliert¹⁸⁵, und stimmt zum anderen die nötigen Schutzmaßnahmen

gegen ROS aufeinander ab. So steht etwa die Aktivität von Peroxiredoxin und der Nukleotid-Exzisions-Reparatur ebenso unter circadianer Kontrolle, wie die Ausschüttung von Melatonin, welches neben seiner Funktion als Synchronisator peripherer circadianer Uhren als Antioxidans reaktive Sauerstoffspezies neutralisiert.^{122,192}

Bei einer Störung circadianer Rhythmen bzw. einer Störung der Synchronisation zwischen einzelnen Nerven- und Gliazellen könnte es demnach der vermehrte oxidative Stress sein, der dann sekundär zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine, zu mitochondrialen Dysfunktionen sowie zur Initiation neuroinflammatorischer Kaskaden führt und damit die Grundlage für die Fehlfunktion und den Untergang von Nervenzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen bildet.¹⁹²

1.6 Hypothese der vorliegenden Arbeit

Trotz zahlreicher Erkenntnisse zum korrelativen Zusammenhang zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und Störungen circadianer Rhythmen, gibt es vergleichsweise wenige Arbeiten, welche die Grundlagen dieser Korrelation beleuchten, und versuchen, sie in reduktionistischer Manier auf zellulärer Ebene nachzuvollziehen.

Aus diesem Bedarf heraus, ist die vorliegende Arbeit entstanden, deren Basis von folgender Hypothese gebildet wird:

Störungen der circadianen Rhythmik wirken sich schädlich auf die Resistenz gegenüber Sauerstoffradikalen, die Protein-Homöostase, sowie die Differenzierungsfähigkeit, die Gesundheit und das generelle Überleben von Säugetier-Nervenzellen aus.

Direkte Grundlage dieser Schrift sind die Untersuchungen, die durch meine Kollegin Dr. Nora Rubbe im Rahmen ihrer strukturierten Promotionsarbeit am Institut für medizinische Psychologie durchgeführt wurden.

Sie hat in ihrer Dissertation die grundsätzliche Methodik der N2a-Zellkultur etabliert, welche auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wird. So konnte sie zeigen, dass die Behandlung von Mäuseneuroblastomzellen (N2a) mit dem Histon-Deacetylaseinhibitor LBH-589 (Panobinostat) in Kombination mit einer Reduktion der Serumkonzentration im Medium auf 0,5% zur Induktion einer künstlichen Zellalterung (Seneszenz) führt. Im Rahmen dieser Zellalterung werden die einzelnen Zellen größer und bilden mehr Zellausläufer. Siehe hierzu Abbildung 8.

LBH-treatment increases the percentage of senescent N2A cells in 0.5 % FBS medium

A

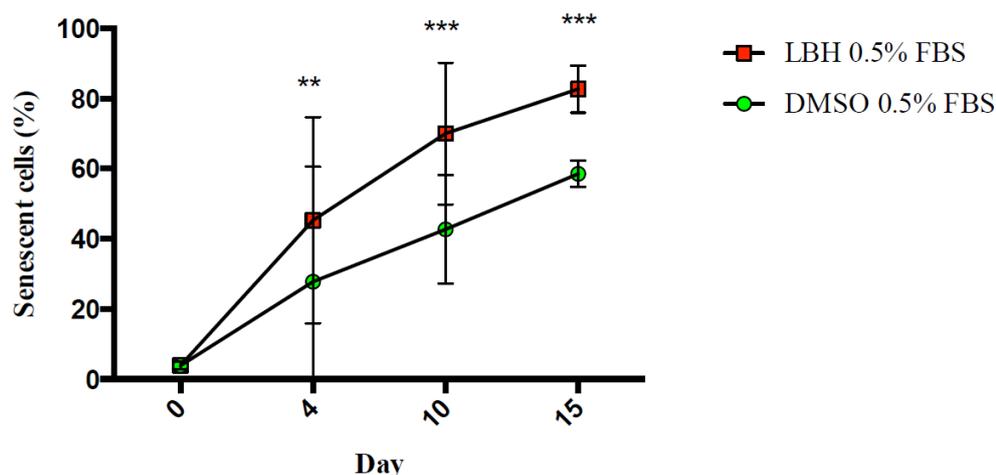


Abbildung 5: Dargestellt ist der Anteil seneszenten Zellen über einen Zeitraum von 15 Tagen. Eine Beta-Galactosidase-Färbung der N2a-Zellen zeigt, dass LBH zu einer stärkeren Seneszenzinduktion führt als DMSO, und dass die Seneszenz mit zunehmender Inkubationsdauer zunimmt. Aus Rubbe, Nora (2021): *The interaction between the circadian clock, temperature entrainment and the insoluble protein content*. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät.

Nach dem gleichen Protokoll in die Seneszenz überführte N2a-Zellen dienen auch in der vorliegenden Arbeit als Modell für gealterte Säugetiernervenzellen.

Ebenso konnte Dr. Rubbe zeigen, dass die Seneszenzinduktion und folgende Inkubation der Zellen über 15 Tage zu einem erhöhten Anteil unlöslicher Proteine innerhalb der Zellen führen. Darüber hinaus zeigte sich, dass in jenen Zellen, die in dieser Zeit zyklischen Temperaturbedingungen (12h 34 °C / 12h 37 °C) ausgesetzt waren, der Anteil an unlöslichem Protein geringer war als in Zellen, die unter konstanten Temperaturbedingungen (24h 37 °C) gehalten wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. In diesen Experimenten wurde auch noch eine dritte experimentelle Bedingung mit wechselnden Temperaturen in einem nicht 24-h-Zyklus (9:9 Stunden) untersucht, wobei keine Unterschiede im Anteil unlöslicher Proteine zwischen 24h- Rhythmus und Nicht-24h-Rhythmus festgestellt werden konnten.

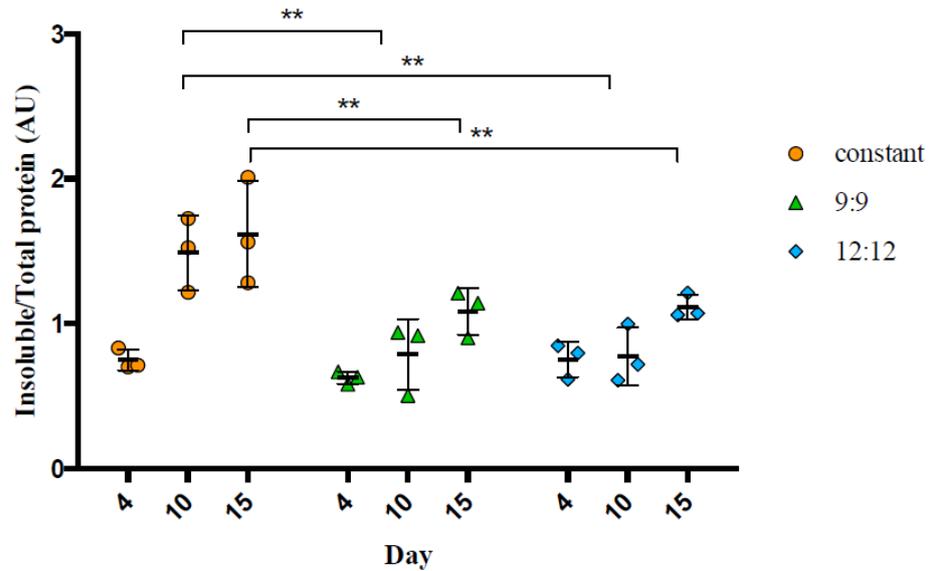


Abbildung 6: Dargestellt ist das Verhältnis von unlöslichem Proteinanteil zum Gesamtprotein unter verschiedenen Temperaturbedingungen (Konstant 37 °C, 9:9 Stunden 34 °C/ 37 °C, 12:12 Stunden 34 °C/ 37 °C). Es zeigt sich eine signifikante Verminderung des Anteils unlöslicher Proteine unter zyklischen Temperaturbedingungen. Aus: Rubbe, Nora (2021): The interaction between the circadian clock, temperature entrainment and the insoluble protein content. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät

Insgesamt weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass mit seneszenten N2a-Zellen ein adäquates Modell für gealterte Säugetier-Nervenzellen vorliegt und dass starke circadiane Zeitgeber die Bildung von Proteinaggregaten in Säugetier-Nervenzellen verringern können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2

Verwendete Medien, Chemikalien und Reagenzien	
Gibco DMEM (1X) + GlutaMAX™	REF: 31966-021
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham D6434-500ml	REF: D6434-500ML, Sigma Aldrich
Gibco TrypLE™ Express	REF 12604-013, Thermo Fisher Scientific
PBS	D8537-500ML, Sigma
Dimethyl sulfoxide Cell culture grade	A3672,0250, AppliChem
Panobinostat (LBH589)	Cat-Nr. 1612, BioVision, USA
Brilliant Blue R-250	B7920-10G, Sigma-Aldrich
Methanol ≥99.8%, HiPerSolv CHROMANORM® für die HPLC	152507P, VWR Chemicals
Essigsäure	A3686,1000, AppliChem
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	G9711, Promega
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	11836170001, Sigma-Aldrich
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	04 906 0387 001, Sigma-Aldrich
Tris ultrapure	A1086,1000, AppliChem
NaCl	AM9760G, gibco
EDTA Lösung pH8 (0,5M)	A3145,1000, AppliChem
SDS	L4522, Sigma-Aldrich
IGEPAL CA630	I8896-50ML, Sigma
UREA	29700, gibco

DTT	D0632-10G, Sigma-Aldrich
Benzonase	E1014, Sigma-Aldrich
Triton-X-100	T8787-100ML, Sigma
H ₂ O ₂ , 30 wt% in H ₂ O	216763-100ML
Paraformaldehyd	158127-500G, Sigma-Aldrich
NaOH	1310-73-2, Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin	A7906-100G, Sigma-Aldrich
Monoclonal Anti- β -Tubulin III (neuronal) antibody produced in mouse	T8578, Sigma-Aldrich
Monoclonal Anti-Neurofilament 200 (Phos. and Non-Phos.) antibody produced in mouse	N0142, Sigma-Aldrich
Antibody-CF™ 488A Conjugates	SAB4600388, Sigma Aldrich
DAPI	D9542, Sigma Aldrich
VectaShield- Mounting medium)	H-1000, Vector Laboratories

Tabelle 3

Platten und Flaschen zur Zellanzucht	
TC Flask T75,Stand.,Vent. Cap	83.3911.002, Sarstedt
TC Flask T75,Standard	83.3911, Sarstedt
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, weiß	136101, Thermo Scientific
Corning® 96 Well Half-Area Microplate	3885, Corning incorporated
TC-Platte 24 Well,Standard,F	83.1836, Sarstedt
Klebefolie für 96-well-Platten	REF 4360954, applied biosystems

Tabelle 4

Geräte und Instrumente
New Brunswick Galaxy 170R Inkubator
Panasonic MIR 154-PE Cooled Incubator
Sanyo MIR-153 Refrigerated Incubator
Leica DM IL LED FLUO Inverses Labormikroskop
Leica ICC50 HD
Leica Application Suite Version 3.0.0
Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser
Grant Instruments™ Grant Bio™ PMR-30 Compact Fixed-Angle Platform Rocker
Eppendorf Centrifuge 5417R
„HOBO Pendant® Temperature/Light 64K Data Logger (Part # UA-002-64)

Tabelle 5

Selbst angesetzte Puffer	
RIPA-Puffer	50mM Tris pH8; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,5% SDO, 1% IGEPAL CA630
Urea-Puffer	8 M Urea, 2 % SDS, 50 mM Dithiothreitol, 50 mM Tris pH 8
Coomassie Brilliant Blue Lösung	20ml Methanol, 10ml Essigsäure, 625mg Coomassie Brilliant Blue R-250, Auffüllen auf 50ml mit PBS)

2.2 Zusammenfassung der Methodik

Zur Untersuchung der oben genannten Hypothese wurden murine Neuroblastomzellen kultiviert, bei denen durch Seneszenzinduktion ein künstlicher Alterungsprozess herbeigeführt wurde. Dieser hat die Ausbildung eines neuronähnlichen Phänotyps zur Folge und wird als Modell für gealterte Säugetier-Nervenzellen verwendet.

Am Tag der Seneszenzinduktion wurden die Zellen in drei unterschiedliche experimentelle Gruppen aufgeteilt. Die experimentellen Bedingungen dieser Gruppen unterschieden sich dabei allein in der Umgebungstemperatur.

Die Umgebungstemperatur von Zellen der Gruppe 1 betrug konstant 34 °C, die von Gruppe 2 wechselte alle 12 Stunden zwischen 34°C und 37 °C, während die Umgebungstemperatur der Zellen in Gruppe 3 konstant 37 °C betrug

Zehn Tage nach Seneszenzinduktion wurden die Zellen der verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Methoden hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit, ihrer ROS-Stressresistenz, der exprimierten Proteine und der Differenzierungsfähigkeit/ Anzahl der Nervenzellfortsätze untersucht.

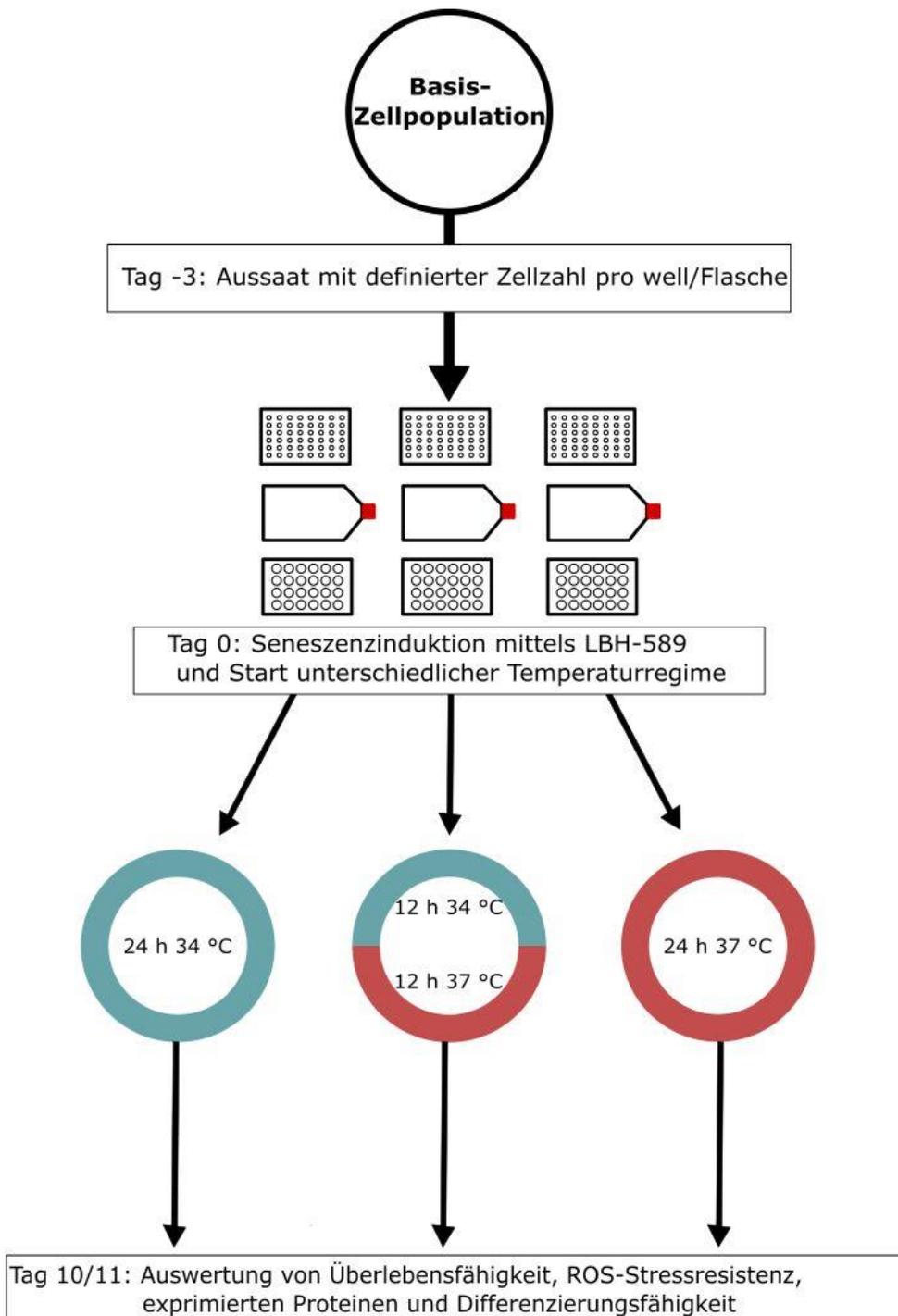


Abbildung 7: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise. Aus der Zellpopulation N2a-Zellen (murine Neuroblastomzellen) wird eine definierte Anzahl an Zellen ausgesät. Nach drei Tagen wird mittels des Histon-Deacetylase-Inhibitors LBH-589 (Panobinostat) die Seneszenz (künstliche Zellalterung) der Zellen initiiert und die Zellen infolgedessen unterschiedlichen experimentellen Bedingungen in Form von unterschiedlichen Temperaturregimes ausgesetzt (Konstant 37 °C, Konstant 34 °C, Zyklischer Wechsel alle 12 Stunden zwischen 34 °C und 37 °C). Die Mediumwechsel erfolgten jeweils zum gleichen Zeitpunkt etwa alle 3-4 Tage. An Tag 10 bzw. 11 nach Seneszenzinduktion erfolgte dann die Auswertung im Hinblick auf Überlebensfähigkeit, ROS-Stressresistenz, Proteinexprimierung und Differenzierungsfähigkeit i.S. eines neuronalen Phänotyps.

2.3 Grundsätzliche Methodik der Zellkultur

Zur experimentellen Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Zeitgeberintensitäten auf Zellen neuronaler Genese wurden murine Neuroblastoma-Zellen der Linie N2a (Neuro-2a ATCC® CCL-131™) verwendet, welche von der Firma ATCC erworben wurden. N2a-Zellen werden bereits seit Jahrzehnten eingesetzt, um neuronale Differenzierungs- und Wachstumsprozesse zu untersuchen^{216,217} und die Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen wie etwa Chorea Huntington und die Creuzfeld-Jakob-Krankheit zu erforschen.²¹⁸⁻²²¹ Hierfür eignet sich diese Zelllinie besonders gut, da sie auf eine verminderte Serumkonzentration und andere Umweltreize mit Differenzierung und der Ausbildung von Neuriten reagiert.²¹⁷

Kultiviert wurden diese Zellen primär in Kulturflaschen des Typs „T75 Tissue Culture Flask Red Vent Cap“ aus Polystyrol. Um einen Gasaustausch mit der 37 °C warmen und mit 5% CO₂ angereicherten Luft des Inkubators vom Typ New Brunswick Galaxy 170 R zu ermöglichen, wurden Flaschen mit gasdurchlässigen Filterdeckeln verwendet.

Als Standardmedium kam DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement von gibco zum Einsatz, welches mit 10% FBS und 0,4% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin) versehen wurde. Der Mediumwechsel erfolgte mit einer Regelmäßigkeit von 3-4 Tagen.

Beim Mediumwechsel wurde gleichzeitig eine Verdünnung der Zellmasse auf 1/10 vorgenommen, um das dauerhafte Wachstum der Kultur zu gewährleisten.

Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde das alte Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen einer Inkubation mit 1ml Trypsin unterzogen, welches fünf Minuten bei 37°C auf die adhärenen Zellen einwirkte. Das Enzym Trypsin sorgt durch seine proteolytische Aktivität für eine Vereinzelnung sowie eine Lösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche. Nach der Kontrolle auf Vereinzelnung und Ablösung der Zellen vom Boden wurde das TrypLE-Enzym durch die Zugabe von 5ml des oben genannten DMEM-Mediums neutralisiert. Um die vollständige Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu gewährleisten und sie für die weitere Bearbeitung zu vereinzeln, wurde dieser anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Zell-Medium-Enzym-Gemisches gespült. Daraufhin wurden etwa 90% des Gemisches mit Hilfe einer Glaspipette und einem Sauger abgesaugt und verworfen. Zu den in der Flasche verbleibenden Zellen wurden dann 10ml des oben genannten Mediums hinzugegeben und die Inkubation bei 37° und 5% CO₂ fortgesetzt.

Für all diese Arbeiten wurden kalibrierte Pipetten der Serie „Reference“ und „Research plus“ der Firma Eppendorf verwendet.

2.4 Grundsätzliche Methodik der Experimente

Für alle Experimente wurde eine definierte Anzahl an Zellen in ein neues Behältnis (Kulturflasche bzw. Kulturplatten) überführt. Hierzu wurden der Zellverdünnungsprozess wie oben beschrieben durchgeführt, wobei nach der Ablösung und Vermischung mit Medium 5ml der Suspension in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen transferiert wurden. Anschließend wurde das Gemisch bei 800rpm 5 Minuten lang zentrifugiert, um die Zellen vom Trypsin-Medium-Gemisch zu trennen. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 5 ml frischen Mediums vermischt. 50µl der Zellsuspension wurden mit einer Pipette entnommen und mit 50µl Trypanblau vermischt. Nach einer Einwirkzeit von 2 Minuten wurde die Suspension gemischt und mittels einer Neubauer improved Zählkammer anschließend die Anzahl der Zellen bestimmt. Die jeweils bei den einzelnen Experimenten angegebenen Zellzahlen wurden anschließend mit o.g. Standardmedium in die Kulturflaschen verbracht und zunächst drei Tage lang bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert, um eine Adhärenz an den Flaschen- bzw. Plattenboden zu ermöglichen.

Am dritten Tag nach dem Aussäen der Zellen wurde in allen Experimenten die Seneszenz der Zellen induziert.

Zur Seneszenzinduktion und -aufrechterhaltung wurde das bisherige Medium durch ein Medium mit auf 0,5% FCS reduziertem Serumgehalt ausgetauscht (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham mit 0,5% FCS, 5ml Glutmax und 0,4% Penicillin-Streptomycin). Durch die Reduktion der Serumkonzentration werden EGFR-Akt-, und Erk 1/2- abhängige intrazelluläre Signalwege aktiviert, welche zu stärkerer Differenzierung der Neuroblastomzellen führen²²² und die Vulnerabilität der Zellen gegenüber Stressoren (wie etwa oxidativen Stress) erhöhen.²²³ Daher wird die Inkubation von Neuroblastomzellen in Medium mit erniedrigtem FCS-Gehalt bereits seit Jahrzehnten als Modell für neuronale Alterungsprozesse verwendet.²²³

Eine derartige Induktion der Zelldifferenzierung und -alterung wurde darüber hinaus in der vorliegenden Arbeit durch die Zugabe des Histon-Deacetylase-Inhibitors LBH-589 (Panobinostat) verstärkt. Hierfür wurden 15µl einer 15 mikromolaren LBH-589 in DMSO-Lösung in 10ml des DMEM/F12 Mediums verbracht und nach Durchmischung zu den Zellen gegeben.

LBH-589 (Panobinostat) ist ein Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) aus der Gruppe der Hydroxamsäuren²²⁴, welcher therapeutisch zur Krebstherapie eingesetzt wird und in der Zellkultur zur Induktion von Seneszenz dient.^{225,226} Es konnte gezeigt werden, dass Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf Neuroblastomzellen primär über einen Zellzyklusarrest und die Initiierung von Differenzierung wirken.²⁵ Die Kombination aus FCS-Reduktion und Zugabe von LBH führt daher, wie in der Einleitung näher ausgeführt, zu einer Zellalterung (Seneszenz) und einer mikroskopisch feststellbaren Veränderung der Zellen hin zu einem neuronalen Phänotyp wie in Abbildung 8 ersichtlich wird.

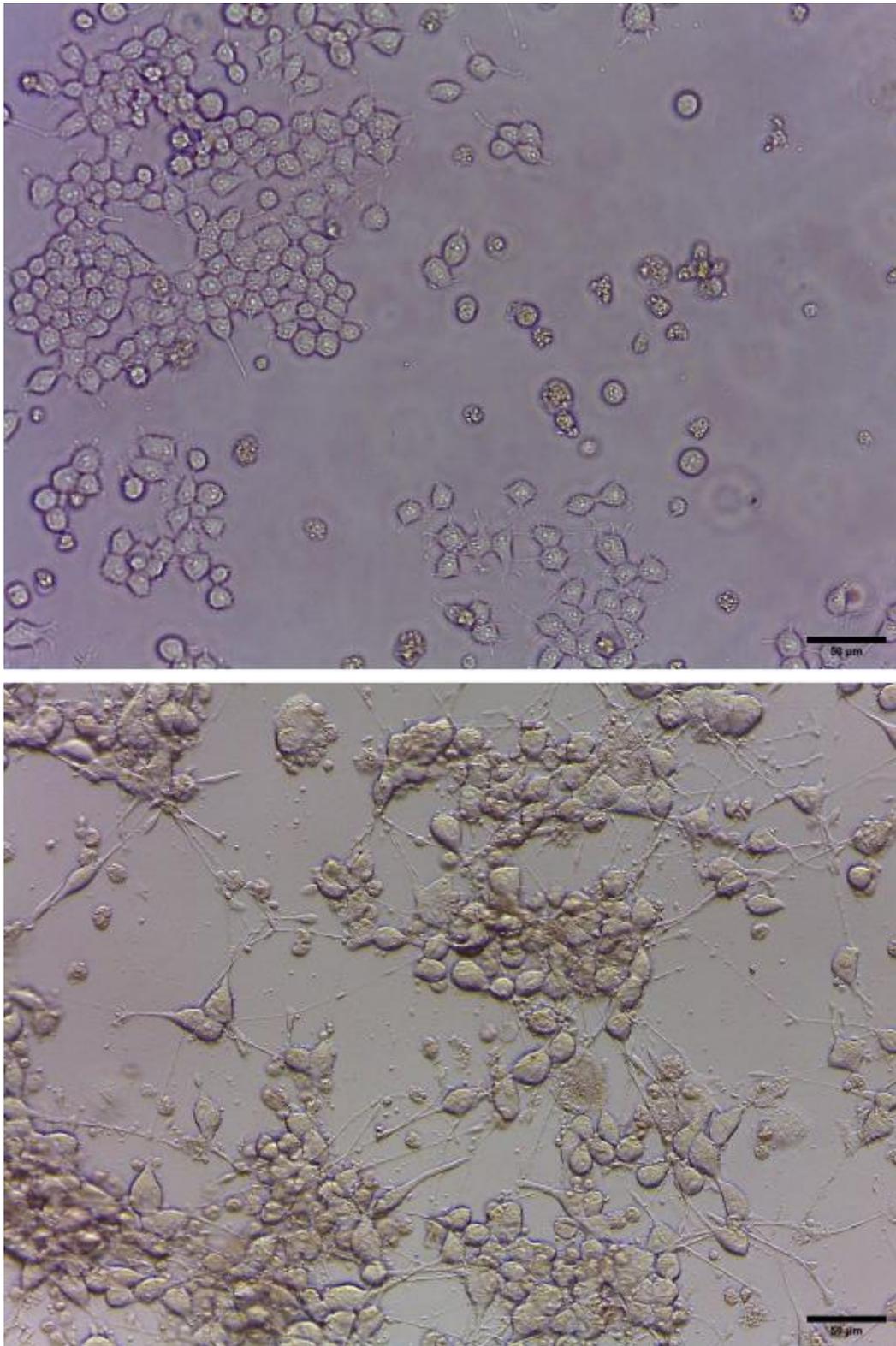


Abbildung 8: Vergleich der N2a-Zellen vor und nach Seneszenzinduktion wie im Text beschrieben. Das obere Bild wurde unmittelbar vor der Seneszenzinduktion aufgenommen, das untere Bild am Tag 10 nach Seneszenzinduktion. Zu sehen ist insbesondere eine Abflachung der Zellen und die vermehrte Ausbildung von Zellausläufern zwischen den Zellen. Vergrößerung: 20-fach, Maßstabsbalken: 50µm

Mit dem Zeitpunkt der Seneszenzinduktion begann darüber hinaus die Aufteilung der Zellen in die unterschiedlichen Temperaturregimes.

Hierfür wurden die drei in der „Geräte und Instrumente“-Tabelle genannten Inkubatoren verwendet. Diese wurden programmiert, sodass die Temperatur im Inneren konstante 37 °C, konstante 34 °C bzw. alternierend 12 h 37 °C und 12h 34 °C betrug. Die dauerhafte Einhaltung dieser Temperaturbedingungen wurde mit Hilfe von Messgeräten vom Typ „HOBO Pendant®“ überprüft.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage etwa zur selben Uhrzeit um 10 Uhr vormittags. Hierfür wurde das gleiche Medium mit identischer LBH-589 bzw. DMSO – Konzentration verwendet wie bei der Seneszenzinduktion.

Die verschiedenen Temperaturregimes basieren auf zuvor durchgeführten Experimenten im Institut für medizinische Psychologie sowie auf publizierten Studien. So zeigten in vivo Studien, dass in Mäusehirnen eine Temperaturdifferenz von 3 °C zwischen Zeiten der Aktivität und Zeiten der Inaktivität vorherrscht.²²⁷

Ebenso liegen Studien vor, die nachweisen konnten, dass Zellen von Mäusen und Ratten auch in vitro durch zyklische Temperaturwechsel eine circadian kontrollierte Genexpression aufweisen.¹³⁶ Noch nicht publizierte, im Institut für medizinische Psychologie durchgeführte Experimente konnten zeigen, dass nur jene Temperaturzyklen zu einer verlässlichen Phasenkopplung (Entrainment) in den Zellen führen, die einen Zyklus von 24 Stunden aufweisen. Darum erfolgte der Temperaturwechsel alle 12 Stunden.

Bisher wurde nur das allgemeine, bei allen Experimenten identisch durchgeführte Vorgehen geschildert, welches außerdem durch Abbildung 7 verdeutlicht wird. Die jeweils spezifischen Materialien und Methoden -insbesondere der Auswertung - werden im Folgenden näher erläutert.

2.5 Analyse des Proteingehalts und des Proteoms

Um den Proteingehalt und die Zusammensetzung des Proteoms zu ermitteln, bedurfte es zunächst der Ernte und des Aufschlusses der zuvor angezüchteten Zellen. Anschließend erfolgte die Extraktion. Die noch ausstehende massenspektrometrische Analyse der Proteine ist nicht Teil dieser Arbeit

2.5.1 Anzucht und Inkubation

Zur Extraktion der Proteine für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden je 10⁶ Zellen in insgesamt sieben Kulturflaschen des Typs T75 mit filterlosen Deckeln ausgesät. Nach der Inkubationszeit von drei Tagen wurde bei einer Flasche die Zellernte und Proteinextraktion wie unten beschrieben vorgenommen (Tag 0), während bei den verbleibenden sechs Flaschen die Seneszenzinduktion mit 10ml DMEM-F12-Medium (0,5% FCS) und 15 µl DMSO mit 15µM LBH-589 bzw. 15µl DMSO durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte bei diesen die Inkubation nach folgendem Schema:

Konstant 37 °C:

- 1 Flasche mit LBH-589 Behandlung
- 1 Flasche mit DMSO-Behandlung

Konstant 34°C:

- 1 Flasche mit LBH-589 Behandlung
- 1 Flasche mit DMSO-Behandlung

Zyklischer Wechsel 12h 37 °C / 12h 34 °C:

- 1 Flasche mit LBH-589 Behandlung
- 1 Flasche mit DMSO-Behandlung

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage zur selben Uhrzeit. Es wurde das gleiche Medium mit identischen LBH-589 bzw. DMSO – Konzentrationen verwendet wie bei der Seneszenzinduktion.

2.5.2 Zellernte am Tag 10 nach Seneszenzinduktion

Bei der Zellernte werden die Zellen aus dem Aufzuchtgefäß herausgelöst, um sie der weiteren Analyse zugänglich zu machen. Dies geschah unter ständiger Eiskühlung, um eine Autoprotolyse - und damit eine Verfälschung der Ergebnisse - zu verhindern.

Nach Abpipettierung des Medium-Überstandes wurden die Zellen mit 10ml kaltem PBS (Firma Sigma-Aldrich, siehe Abschnitt: 2.1 Material) gewaschen, um alle Mediumreste zu entfernen. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch einen Zellschaber in Anwesenheit von 3ml kaltem PBS, welche zuvor mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (cCompleteTM Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, PhosSTOP Phosphatase Inhibitor, Sigma-Aldrich) vermengt worden waren, um eine nachträgliche Spaltung und/oder Dephosphorylierung zu verhindern.

Die Zellsuspension wurde in zwei 1,5ml Eppendorfröhrchen aufgeteilt sowie für die Dauer von 5 Minuten bei 4 °C und einer Zentrifugalbeschleunigung von 1000 rcf zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Tiefkühltruhe mit -72 °C gelagert.

2.5.3 Proteinextraktion

Zur Analyse des Proteoms ist es notwendig, die Zellmembran zu zerstören und den Zellinhalt freizusetzen. Da dabei auch andere membranumschlossene Organellen, wie etwa die Lysosomen aufgeschlossen werden, ist die Zugabe von Proteaseinhibitoren und die Schaffung einer alkalischen, Ca²⁺ und Mg²⁺ - armen Umgebung durch basische Puffer und Chelatoren notwendig, um eine Hydrolyse durch zelleigene Enzyme zu verhindern. Aus demselben Grund wurden alle Arbeitsschritte unter Eiskühlung durchgeführt.

Für dieses Experiment wurde außerdem zwischen RIPA-löslichen und RIPA-unlöslichen Proteinen differenziert, um einen Anhaltspunkt für die Tendenz zur Aggregatbildung zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen zu erhalten.

Der RIPA-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 5 im Abschnitt 2.1) dient dabei dazu, die Zellmembranen aufzubrechen (zu lysieren). Dies ermöglicht erst die Extraktion der Proteine zur weiteren Analyse. Die chemischen Bindungen innerhalb von Proteinen und zwischen verschiedenen Proteinen (wie sie beispielsweise in Proteinaggregaten vorkommen) werden durch den Puffer nur geringfügig beeinträchtigt.²²⁸ Der Urea-Lyse-Puffer hingegen denaturiert die Bindungen zwischen Proteinen deutlich stärker²²⁸ und ermöglicht so die genauere Spezifizierung auch jener Proteine, die im RIPA-Puffer nicht voneinander gelöst werden konnten (beispielsweise weil sie Aggregate gebildet haben).

Zur Lyse der Zellen wurden 600 µl von kaltem protease- und phosphataseinhibitorhaltigem RIPA-Puffer und 1 µl Benzonase (zum Abbau von Nukleinsäuren) zum Zellpellet gegeben. Das Pellet wird anschließend eine Stunde lang bei -4 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Um eine Durchmischung und vollständige Zellyse zu erreichen, wurde das Lysat zehnmal mit einer 22 Gauge Nadel aspiriert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4 °C auf demselben Schüttler wurden 30 µl des Lysates entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß der Marke Eppendorf transferiert und dort mit 30 µl Urea-Lyse-Puffer auf einem Vortex-Mischer durchmengt, um die Denaturierung aller Proteine und die Auflösung eventueller Aggregate sicher zu stellen („Gesamtprotein“). Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte das Einfrieren durch flüssigen Stickstoff und die Lagerung bei -72 °C.

Zur Differenzierung zwischen löslichem und unlöslichem Protein wurden die verbleibenden 570 µl des Lysates bei 20.000 rcf und 4 °C für die Dauer von 15 Minuten zentrifugiert, wodurch eine Ansammlung des unlöslichen Proteinanteils am Boden des Röhrchens erreicht wird.

Der mit löslichem Protein angereicherte Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Röhrchen transferiert („lösliches Protein“), eingefroren und bei -72 °C gelagert.

Das verbleibende Protein-Pellet („unlösliches Protein“) wurde wie das „Gesamtprotein“ mit Urea-Puffer vermengt, gemischt und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur ebenfalls eingefroren und bei -72 °C gelagert.

2.6 Messung der Zelldifferenzierung

Die Differenzierung von N2a Zellen zeigt sich nicht nur durch eine Veränderung des Proteoms, sondern auch morphologisch durch die Abflachung des Zellkörpers und die Ausbildung von Axonen und Dendriten.^{217,222}

Um die morphologische Komponente der Differenzierung zu erfassen und die Zellen der verschiedenen experimentellen Gruppen diesbezüglich miteinander zu vergleichen, wurde eine unspezifische Proteinfärbung mittels Coomassie Brilliant Blue R-250 durchgeführt. Durch dieses Reagenz werden die Zellen in ihrer Gänze inklusive der Zellfortsätze intensiv blau eingefärbt, was den Kontrast im Vergleich zur Unterlage der Zellkulturplatte deutlich

erhöht. Hierdurch wird es ermöglicht, unter dem Mikroskop besser differenzierte Zellen (mit vielen und langen Ausläufern) von schlechter differenzierten Zellen zu unterscheiden sowie die Interkonnektivität der Zellen zueinander zu bestimmen.

Eine weitere Methode, um den Differenzierungsgrad zwischen verschiedenen Zellpopulationen zu ermitteln, besteht darin, neuronenspezifische Markerproteine nachzuweisen, welche in der neuronalen Differenzierung eine wichtige Rolle spielen, und anschließend den Grad der Expressierung zwischen den Zellpopulationen zu vergleichen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür zwei verschiedene neuronale Proteine ausgewählt: Klasse III- β -Tubulin und die schwere Kette des Neurofilaments. Als Nachweismethode diente die immunzytochemische Färbung dieser Proteine mittels Antikörpern.

2.6.1 Aussaat und Inkubation

Hierzu wurden zunächst 8000 Zellen pro Well in Mikrotiterplatten mit je 24 Wells ausgesät. Nach der Inkubationszeit von drei Tagen wurde die Seneszenzinduktion und folgende Inkubation wie im Abschnitt 2.4 beschrieben durchgeführt, wobei pro Well 512 μ l des Medium-LBH bzw. Medium-DMSO- Gemisches verwendet wurden. Um eine Austrocknung der Wells zu verhindern, wurden diese mittels wasserundurchlässiger Klebefolien abgedeckt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

2.6.2 Fixierung und Färbung mit Coomassie

Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte am Tag 10 nach Seneszenzinduktion.

Hierzu wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und durch 600 μ l eines -20 °C kalten Methanol-PBS-Gemisches (90 % Methanol, 10% PBS v/v) ersetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei -20 °C wurde die Fixationslösung entfernt und eine Färbung mit einminütiger Inkubationszeit bei Zimmertemperatur vorgenommen. Als Färbemittel dienten pro Well 500 μ l Coomassie Brilliant Blue Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 5 im Abschnitt 2.1).

Anschließend wurde das überschüssige Färbemittel abpipettiert und die Wells einmal mit 500 μ l PBS und drei Mal mit 500 μ l H₂O gewaschen.^{229,230}

2.6.3 Auswertung der Coomassie gefärbten Zellen

Um eine verblindete Auswertung zu ermöglichen, wurde die Beschriftung der Mikrotiterplatten durch eine am Experiment unbeteiligte Institutskollegin abgeklebt und mit zufällig ausgewählten italienischen Substantiven neu benannt, sodass nicht mehr erkennbar war, welche Platte welchen Temperaturbedingungen ausgesetzt war.

Zur Auswertung wurde das Leica Mikroskop Leica DMIL LED Fluo mit einer 20-fachen Vergrößerung verwendet. Mit Hilfe der Mikroskopkamera vom Typ Leica ICC50 HD und dem zugehörigen Computerprogramm Leica Application Suite Version 3.0.0 wurden von 4 Wells pro Temperaturregime jeweils 5 Fotografien im TIFF-Format (Abmessungen 2048 x

1536 Pixel, 24 bpp, 96 dpi) an definierten Orten (12, 2, 4, 8 und 10 „Uhr“) angefertigt. Die detaillierte Auswertung des Bildmaterials erfolgte dann händisch mit Hilfe des „Cell Counter“ - Plugins des Programms ImageJ (Version 1.51r). Mit Hilfe dieses Plugins können farbliche Markierungen in Fotos angebracht werden. Während die Entscheidung über das Anbringen einer Markierung bei der Benutzerin / beim Benutzer liegt, zählt das Programm automatisch die Anzahl der vorgenommenen Markierungen und erlaubt so eine vereinfachte Quantifizierung. In drei unabhängigen Experimenten wurden auf diese Weise insgesamt 6832 Zellen (im Mittel ca. 82 Zellen pro angefertigtem Foto bei 30 Fotos pro experimenteller Bedingung) auf ihren makroskopischen Differenzierungsgrad hin untersucht.

Die Operationalisierung der Differenzierung wurde folgendermaßen vorgenommen:

- Anzahl der Zellen mit Zellausläufern, welche die Länge des zugehörigen Zellkörpers überschreiten
- Anzahl der Zellen, die mit ihren Zellausläufern Verbindungen zu anderen Zellen eingehen

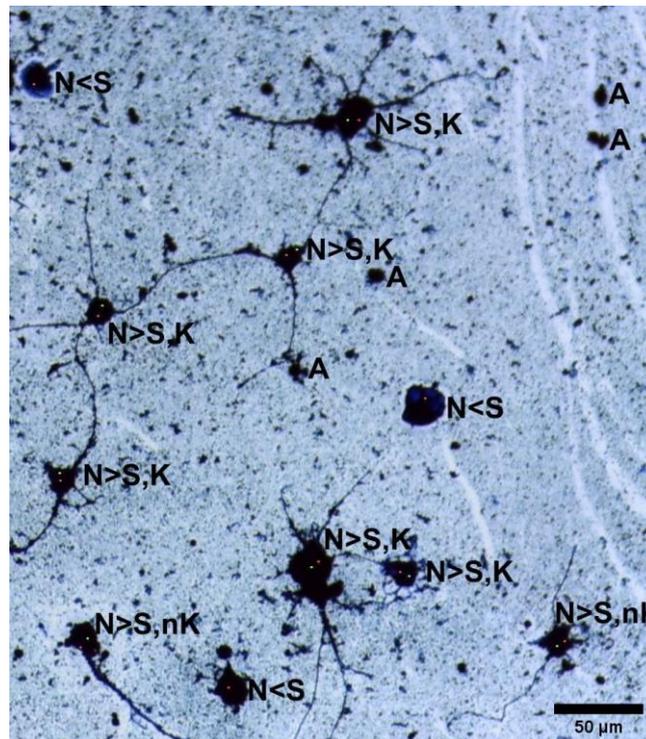


Abbildung 9: Dies ist ein beispielhafter Bildausschnitt, welcher die angefärbten Zellen und ihre Klassifizierung zeigt. „N>S“: Neuriten größer als Soma, „N<S“: Neuriten kleiner als Soma, „K“: Konnektivität zu anderen Zellen vorhanden, „nK“: Keine Konnektivität zu anderen Zellen vorhanden, „A“: Artefakt. Repräsentativ ausgewählter Ausschnitt aus einem Bild mit 10-facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 50µm

Die Anzahl dieser so als „differenziert“ operationalisierten Zellen wurde in Beziehung gesetzt zur Gesamtzahl der auf einer Fotografie abgebildeten Zellen.

Erst nach dieser Analyse wurden die Klebeetiketten entfernt, um eine Zuordnung der Platten zu den verschiedenen experimentellen Bedingungen zu ermöglichen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism, Version 8.4.3.

Zunächst wurde eine Analyse auf Ausreißer vorgenommen. Während das Programm in der Untersuchung Neuriten > Soma keine Ausreißer feststellte, wurden bei der Untersuchung der Daten zur Konnektivität unter 20 Datenpunkten drei Ausreißer in der Gruppe konstant-34 °C erkannt und entfernt. Außerdem wurden händisch 6 Datenpunkte der Gruppe zyklisch entfernt, da es in einem Experiment zu einer Fehlverteilung von Zellen in 2 Wells kam.

Daraufhin erfolgte die Analyse auf eine Normalverteilung der Daten. Hierbei zeigte sich im Kolmogorov-Smirnov-Test, dass aller Wahrscheinlichkeit nach ($p > 0.05$) eine Normalverteilung der Daten vorliegt.

Ebenso zeigten sich weder im Prown-Forythe-Test noch im Barlett's Test eine signifikante Abweichung der jeweiligen Standardabweichungen voneinander. Anschließend wurde zur Analyse der Daten ein One-way-ANOVA durchgeführt und die Ergebnisse grafisch dargestellt. Darüber hinaus wurde eine „multiple comparisons“-Testung vorgenommen, um die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den drei Temperaturbedingungen zu eruieren.

2.6.4 Grundlagen der Messung der Expressierung neuronenspezifischer Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung

Um eine Färbung der Zellen vorzunehmen, werden diese zunächst mit einer Formaldehydlösung fixiert und anschließend die Zellmembran mit einem Tensid (hier Triton-X-100) durchlässig gemacht. Dies ermöglichte die Einbringung der später hinzugegebenen primären Antikörper in die Zelle. Diese Immunglobuline binden hochspezifisch an die jeweiligen Proteine (in diesem Fall an das Klasse III β -Tubulin und die schwere Kette des Neurofilaments).

Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen wurde vor der Antikörperinkubation ein Blockpuffer hinzugegeben, welcher Rinderalbumin enthält und so die unspezifische Bindung der Primärantikörper an andere als die nachzuweisenden Proteine verhindert.

In einem nächsten Schritt wurde ein Sekundärantikörper (hier CF-488A), welcher an die Fc-Fragmente der Primärantikörper bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, zu den Zellen gegeben. Unter einem Fluoreszenzmikroskop zeigte dann der Fluoreszenzfarbstoff mit seiner Lichtemission die Lokalisation der Sekundärantikörper an, welche an die Primärantikörper gebunden waren, welche wiederum zuvor eine spezifische Bindung an die jeweiligen nachzuweisenden Proteine eingegangen sind. Außerdem wurde noch ein Färbemittel für DNA („DAPI“ - 4',6-Diamidin-2-phenylindol), hinzugegeben. Dies erleichtert die Unterscheidung der einzelnen Zellen, da durch DAPI vor allem der Zellkern intensiv angefärbt wird.

2.6.5 Klasse III β -Tubulin und Schwere Kette des Neurofilaments

Neben Aktin- und Neurofilamenten sind die durch unterschiedliche Gene kodierten Proteine der Tubulin-Gruppe von größter Bedeutung für den Aufbau und die Aufrechterhaltung von Mikrotubuli und damit des Zytoskeletts. Dies gilt für alle eukaryotischen Zellen, insbesondere aber für Nervenzellen, da diese lange Fortsätze ausbilden und daher den Transport von Zellorganellen, Proteinen, Nukleinsäuren etc. entlang der Mikrotubuli über weite Strecken innerhalb der Zelle gewährleisten müssen.²³¹

Eine Schlüsselrolle im neuronalen Zytoskelett scheint dabei das Klasse III β -Tubulin einzunehmen, das fast exklusiv in Neuronen exprimiert wird²³² und dessen erhöhtes Vorkommen in Neuroblastomzellen mit neuronaler Differenzierung assoziiert ist.²³³

Auch Intermediärfilamente nehmen wichtige Funktionen innerhalb von Nervenzellen wahr. Von ihnen bilden die Neurofilamente, welche wiederum nach dem Molekulargewicht in leichte, mittelschwere und schwere Ketten eingeteilt werden, die größte Gruppe. Sie sind am Aufbau des axonalen Zytoskeletts beteiligt und ermöglichen so unter anderem die für die Differenzierung notwendige Bildung und Wegfindung von Axonen. Organisationsdefizite der Neurofilamente konnten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und ALS assoziiert werden.²³⁴

Aufgrund des spezifischen Vorkommens der oben genannten Proteine in Neuronen sowie ihrer wichtigen Rolle bei der Differenzierung von Nervenzellen, bot sich die Färbung dieser Proteine mittels Immunfluoreszenzfarbstoffen an, um den zellulären Differenzierungsgrad der N2a-Zellen, welcher unter den verschiedenen Temperaturbedingungen erreicht wurde, zu erfassen und vergleichbar zu machen.

Hierfür wurden die Primärantikörper „Monoclonal Anti-Neurofilament 200, clone N52, Catalog Number N0142“ sowie „Monoclonal Anti- β -Tubulin III Clone 2G10, Catalog Number T8578“ und der Sekundärantikörper „Antibody-CF 488A Conjugates“ der Firma Sigma-Aldrich verwendet.

2.6.6 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung

Die Aussaat, Seneszenzinduktion und Inkubation der Zellen erfolgten wie in den Abschnitten 2.3 und 2.4 beschrieben, weshalb an dieser Stelle auf eine Wiederholung der Beschreibung verzichtet wird.

Zur Fixierung der Zellen wurde Paraformaldehyd verwendet. Dieses wurde vorbereitend in einem Mischverhältnis von 4 % (m/v) in 60 °C heißem PBS aufgelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Zimmertemperatur wurde der pH mit NaOH auf 7,4 titriert, bevor die Lösung durch einen 50 μ m Filter filtriert wurde. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -20 °C. Zur Durchführung der Experimente wurde die Paraformaldehyd-Lösung bei 56 °C aufgetaut und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

Zur Fixierung wurden die Zellen mit 500 μ l 4 °C kalten Paraformaldehyd-PBS-Gemisch pro Well auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach der Entfernung des Paraformaldehyds wurde jeder Well zweimal mit 500 μ l PBS gewaschen.

Um die Zellwände für die Antikörper permeabel zu machen, wurden anschließend die

Zellen bei Raumtemperatur mit 500 µl/Well einer 0,3-prozentigen (v/v) Triton-X-100 in PBS - Lösung inkubiert. An einen erneuten Waschschrift mit 500 µl PBS, schloss sich dann die fünfzehnminütige Inkubation mit einer 5% Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) in PBS (m/v) an. Ziel dieser Behandlung ist die Blockade unspezifischer Bindungsstellen und damit die Erhöhung der Sensitivität der Färbung. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500µl PBS, erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern. Hierfür wurden die jeweiligen Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit einer 1% BSA (m/v), 0,3% Triton-X-100 (v/v) in PBS-Lösung vermischt und 200 µl/Well davon zu den Zellen gegeben. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4% auf einem Laborschüttler. Pro Platte wurden je vier Wells mit dem Antikörper gegen das Klasse III β-Tubulin beziehungsweise gegen die schwere Neurofilamentkette inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Primärantikörperlösung entfernt und die Wells dreimal mit 500µl PBS gewaschen, wobei jeweils eine Inkubationszeit von 5 Minuten eingehalten wurde.

Daraufhin erfolgte die zweistündige Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur auf einem Laborrüttler mit 200µl/Well einer im Verhältnis 1:5000 verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers CF-488A in einer 1% BSA(m/v), 0,3 % Triton-X-100 in PBS- Lösung. Daraufhin wurde die Sekundärantikörperlösung entfernt und die Wells dreimal mit 500µl PBS gewaschen, wobei jeweils eine Inkubationszeit von 5 Minuten eingehalten wurde.

Anschließend erfolgte die Färbung der Zellkern-DNA mittels DAPI. Hierzu wurde die 5mg/ml-Lösung im Verhältnis 1:10.000 mit PBS gemischt und 200 µl dieser Lösung pro Well für eine Minute zu den Zellen gegeben.

Nach einem letzten Waschschrift mit PBS für 5 Minuten auf einem Laborschüttler wurde das PBS aus den Wells entfernt und diese über Nacht ausgetrocknet.

Um die längerfristige Lagerung der so präparierten Zellen zu ermöglichen und den Brechungsindex zu optimieren, wurde in einem letzten Arbeitsschritt ein Tropfen VectaShield- Mounting medium zu den fixierten Zellen gegeben und diese mit einem Deckglas bedeckt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.6.7 Generierung der Bilder und Auswertung

Die Zellen wurden - nach Verblindung der Platten durch eine Laborkollegin - an einem Fluoreszenzmikroskop vom Typ Zeiss Observer Z1 betrachtet und mit Hilfe der Software Zeiss ZEN Imaging Software zwei Fotos pro Well angefertigt.

Anschließend wurden pro experimenteller Bedingung (Konstant 37 °C, Konstant 34 °C, Zyklisch 34/37 °C) und angefärbtem Protein zwei Bilder von zwei unabhängigen Beobachtern betrachtet und - da eine derartige Fluoreszenzfärbung einen semiquantitativen Test darstellt – auf einen visuell fassbaren Unterschied bei einer der (immer noch verblindet betrachteten) Bedingungen hin überprüft. Da hierbei keinerlei Unterschiede festzustellen waren, wurde auf eine quantitative Auswertung wie etwa die Anzahl gefärbter Zellen und Zellausläufer verzichtet

2.7 Messung der Überlebensfähigkeit der Zellen

Obgleich die Definition von Leben bis heute umstritten bleibt ²³⁵, wird doch gemeinhin anerkannt, dass der Stoffwechsel, also die „Gesamtheit der biochemischen Vorgänge in einem lebenden Organismus, bei denen dieser zur Aufrechterhaltung seiner Funktionen Stoffe aufnimmt, chemisch umsetzt und abbaut“ ²³⁶, für alle Lebewesen eine zentrale Rolle spielt.²³⁷

Daher liegt es nahe, die Funktionsfähigkeit und Viabilität von Zellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen mit Hilfe von metabolischen Parametern zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde für die Quantifizierung der Überlebensfähigkeit der Zellen die Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Substraten durch zelleigene Enzyme verwendet, wobei die Substrate nach Verstoffwechslung zur Lichtemission fähig sind, welche mittels eines Luminometers gemessen werden kann.

2.7.1 Messung der Überlebensfähigkeit mittels des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assays und des MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assays

Die in diesem Abschnitt genannten Aussagen beziehen sich auf die Angaben des Herstellers Promega zu den beiden Assays.^{238,239}

Beide Multitox-Assays basieren auf der Zugabe spezieller Substrate zu den zu untersuchenden Zellen, die von verschiedenen Proteasen im Zellinneren verstoffwechselt werden und danach entweder fluoreszierende Eigenschaften aufweisen (Multitox-Fluor-Assay) oder fluoreszierende und lumineszente Eigenschaften aufweisen (Multitox-Glo-Assay). Durch metabolisch aktive Zellen wird das Substrat so modifiziert, dass es zu einer fluoreszenten Anregbarkeit bzw. einer Lichtemission kommt, wobei die Menge des emittierten Lichts von der Menge des verstoffwechselten Substrats abhängt. Hierdurch soll eine Analyse des Verhältnisses zwischen lebenden und toten Zellen gewährleistet werden. Um die Messung der relativen Zahl lebender Zellen zu ermöglichen, wird bei beiden Assays das Substrat „GF-AFC Substrate“ verwendet. GF-AFC (Glycylphenylalanylaminofluorocoumarin) ist ein mit dem Farbstoff AFC fusioniertes Dipeptid, welches keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen soll. Den Herstellerangaben zufolge kommt es bei lebenden Zellen zu einer Diffusion des GF-AFC ins Innere der Zelle. Dort wird das Substrat dann durch eine Protease verstoffwechselt, die nur in lebenden Zellen aktiv ist. Hierdurch kommt es zu einer Anregbarkeit des veränderten Substrats bei einer Wellenlänge von 390 nm und einer Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 515 nm. In toten Zellen kommt es - mangels Proteasenaktivität - zu keiner Anregbarkeit und ergo zu keiner Lichtemission. Beim zweiten Substrat, welches die Messung der relativen Zahl toter Zellen ermöglichen soll, unterscheiden sich die beiden Assays.

Für den Multitox-Fluor-Assay wird „bis-AAF-R110 Substrate“ (bis-Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Rhodamine 110) verwendet. Dieses Oligopeptid mit gebundenem Rhodamin 110-Farbstoff kann Zellwände nicht durchdringen und wird durch eine Protease gespalten, welche durch lysierte Zellen freigesetzt wird. Durch die Abspaltung von Rhodamin 110 wird das Substrat anregbar bei einer Wellenlänge von 485 nm und emittiert dann Licht mit

einer Wellenlänge von 540 nm. Mit dem Multitox-Fuor-Assay lässt sich demnach durch die unterschiedlichen Verstoffwechslungsprozesse und Anregbarkeiten das Verhältnis lebender zu toter Zellen quantifizieren.

Beim Multitox-Glo-Assay wird zur Messung der lebenden Zellen ebenfalls GF-AFC verwendet. Zur Messung der Zytotoxizität dient das Substrat „AAF-Aminoluciferin“ (Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Aminoluciferin), welches ein Aminoluciferin enthält, das an ein Tripeptid gebunden ist. AAF-Aminoluciferin kann ebenfalls Zellwände nicht durchdringen und wird daher erst bei einer Zerstörung der Zellintegrität verstoffwechselt. Den Herstellerangaben zufolge emittiert das Substrat nach Abspaltung des Luciferins durch die ebenso hinzugegebene „Ultra-Glo Recombinant Luciferase“ Licht, welches durch ein Luminometer gemessen werden kann.

Bei der gleichzeitigen Zugabe beider Substrate (GF-AFC und AAF-Aminoluciferin) soll durch die Messung der Lichtemissionen eine Quantifizierung der relativen Zahlen lebendiger und toter Zellen ermöglicht werden.

2.7.1.1 Bestimmung der Sensitivität des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assays und des MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assays

Zur Bestimmung der Assaysensitivität wurde in 96 well-Platten eine Aussaat von 300, 600, 1.250, 2.500, 5.000 und 10.000 Zellen vorgenommen. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen Digitonin ausgesetzt. Digitonin wird vielfach zur Lysierung von Zellmembranen eingesetzt^{240,241} und führt zum Austreten jener Proteasen, deren Aktivität mit den Multitox Assays gemessen wird.

Daher wurden die mit Digitonin behandelten Zellen anschließend -wie in der Gebrauchsanweisung des Herstellers empfohlen - mit den jeweiligen Assay-Reagenzien versehen. Nach einer Inkubationszeit von 30-60 Minuten wurde die Fluoreszenz und Lumineszenz mittels eines Luminometers vom Typ Mithras LB 940 der Firma Berthold Technologies gemessen. Die für die Fluoreszenzmessung verwendeten Wellenlängen sind bereits im Abschnitt 2.7.1 aufgeführt.

2.7.2 Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit mittels Promega RealTime-Glo

Zur Messung der Überlebensfähigkeit der Zellen wurde außerdem der RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay verwendet.

Dieser setzt sich zusammen aus der NanoLuc™ Luziferase (im Folgenden „Luziferase“ genannt) sowie dem MT Cell Viability Substrate (im Folgenden „Prosubstrat“ genannt). Die Funktionsweise des Assays besteht darin, dass das Prosubstrat im Auslieferungszustand nicht mit der Luziferase reagiert. Erst wenn zuvor in einer metabolisch aktiven Zelle eine Reduktion des Prosubstrats zum Substrat stattgefunden hat, kann letzteres mit der Luziferase reagieren und so zur Emission von Licht führen.²⁴²

Daher korreliert die Menge an emittiertem Licht mit der Menge an metabolisch aktiven – und daher lebendigen – Zellen.

Der Vorteil dieses Assays gegenüber anderen, wie etwa dem MTT Tetrazolium Assay, besteht in der Non-Toxizität der verwendeten Reagenzien. So kann eine kontinuierliche, über mehrere Tage reichende, Echtzeitmessung der Metabolisierungsfähigkeit der Zellen erfolgen, sofern durch regelmäßige Medium- und Assaywechsel eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, Substrat und Luziferase gewährleistet ist. ²⁴²

2.7.2.1 Bestimmung der Assay-Linearität in Abhängigkeit der Zellzahl

Aufgrund der unterschiedlichen metabolischen Aktivität unterschiedlicher Zelltypen, ist es notwendig, vor der Verwendung des Realtime-Glo™-Assays die Linearität des Lichtsignals bei unterschiedlicher Zelldichte zu ermitteln. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die optimale Zellzahl pro Well für das weitere experimentelle Vorgeh

Hierfür wurde in einer weiß-opaken 96 Well Platte eine Zellverdünnungsreihe durchgeführt und gemeinsam mit 80µl DMEM-GlutaMax Vollmedium in je 5 Wells 20.000, 10.000, 5.000, 2.500, 1250 und 0 Zellen (Kontrolle) ausgesät.

Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurde das Medium entfernt, und durch 80µl des DMEM-F12-Mediums mit 0,5% FCS ersetzt. Darüber hinaus wurden 20µl des DMEM-F12-Mediums mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an Luziferase und Substrat in jeden Well pipettiert, sodass letztlich, wie vom Hersteller empfohlen, pro Well 100µl DMEM-F12-Medium mit einer 1X Konzentration des Reagenzes durchmischt waren.

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Lichtemission aus den einzelnen Wells für die Dauer von 21,5 Stunden gemessen.

2.7.2.2 Bestimmung der optimalen Zelldichte seneszenten Zellen

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, war es außerdem notwendig, die Anzahl der auszusäenden Zellen nicht nur von der Assay-Linearität, sondern zugleich von der Zelldichte im einzelnen Well abhängig zu machen, unter anderem, da der Differenzierungsgrad der Zellen davon abhängt.

Entsprechend wurden wie beschrieben in je 5 Wells 20.000, 10.000, 5.000, 2.500, 1250 bzw. 0 Zellen (Kontrolle) ausgesät, wobei in diesem Fall schwarze 96-Well-Platten mit durchsichtigem Boden verwendet wurden, um die mikroskopische Kontrolle der Zelldichte zu ermöglichen.

Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurde das DMEM-Glutamax-Vollmedium entfernt, und durch 200µl DMEM-F12-Medium mit 0,5% FCS ersetzt, welches außerdem zur Seneszenzinduktion 28,13 nM LBH-589 in DMSO bzw. DMSO enthielt.

Diese Platte wurde für 10 Tage bei 37°C inkubiert. An den Tagen 2, 7 und 10 nach Seneszenzinduktion wurde die Dichte und Morphologie der Zellen bestimmt, um die optimale Aussäekonzentration zu ermitteln.

2.7.2.3 Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit der Zellen unter den unterschiedlichen Temperaturregimes

Sowohl aus den Untersuchungen zur Assay-Linearität wie auch aus jenen zur Zelldichte, ergab sich eine optimale Zahl von etwa 2.500 auszusäenden Zellen pro Well in opaken 96 Well Platten mit einer Wachstumsfläche der Böden von 0,34 cm².²⁴³ Da es im Verlauf der ersten Experimente zu Schwierigkeiten im Wachstumsverhalten der Zellen kam, welche sich mikroskopisch wegen der undurchsichtigen Böden nicht beurteilen ließen, wurden für die hier weiter ausgeführten Experimente sogenannte half-area-plates mit einer Wachstumsfläche der durchsichtigen Böden von 0,16 cm² pro Well ²⁴⁴ verwendet.

Um in etwa die gleiche Zelldichte zu gewährleisten, wurden entsprechend für die hier dargestellten Experimente zur Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit 1000 Zellen/Well ausgesät.

Nach dem Aussäen der Zellen in drei half area plates mit DMEM-Vollmedium + GlutaMax, erfolgte die Seneszenzinduktion wie beschrieben mit DMEM-F12-Medium mit 0,5% FCS + LBH-589/ DMSO. Anschließend wurden die drei Platten den unterschiedlichen Temperaturbedingungen ausgesetzt.

Die Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit der Zellen erfolgte ab Tag 4 nach Seneszenzinduktion. Hierzu wurde wie bereits unter 2.7 beschrieben, die Realtime-Glo-Reagenzien in 1X-Konzentration zu frischem DMEM-F12-Medium mit 0,5% FCS + LBH-589 / DMSO hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ erfolgte die Lumineszenzmessung in einem Mithras LB940 Multitechnologie Mikroplattenleser der Firma Berthold Technologies. Weitere Messungen der Lumineszenz erfolgten an Tag 5, 6, 7 und 8 nach Seneszenzinduktion. An Tag 8 wurde zunächst die Lumineszenz gemessen, bevor ein erneuter Medium- und Reagenzwechsel wie eben beschrieben durchgeführt wurde. Dann erfolgte eine weitere Messung an Tag 8 sowie an den Tagen 9, 10 und 11 nach Seneszenzinduktion.

Dieses Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt, die statistische Auswertung erfolgte mittels eines 2way-ANOVA und Tukeys multiple comparisons Tests.

2.8 Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit unter Bedingungen oxidativen Stresses

Aufgrund der bereits erläuterten hohen Relevanz von oxidativem Stress für die Genese unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen und der wichtigen Funktion circadianer Steuerungsfaktoren beim zellulären Umgang mit Sauerstoffradikalen schien es angebracht, die Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit nicht nur im Allgemeinen, sondern insbesondere unter den Bedingungen oxidativen Stresses zu untersuchen.

Zur Induktion von oxidativem Stress wurde Wasserstoffperoxid (H₂O₂) verwendet. Wasserstoffperoxid gilt als zentraler Metabolit im Redox-Stoffwechsel von Säugetierzellen und dient dort in niedrigen Konzentrationen bis etwa 10 nM als wichtiges Signalmolekül, während es in höheren Konzentrationen von über 100 nM zu zellulären Schäden und oxidativem Stress führt.^{245,246}

Zur Untersuchung der Auswirkungen von hohen Konzentrationen Wasserstoffperoxids auf

seneszente Neuroblastomzellen wurden 1000 Zellen/ Well ausgesät. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von drei Tagen erfolgte die Seneszenzinduktion und die Zuteilung zu den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle 3-4 Tage ohne Zugabe der Realtime-Glo™ Reagenzien. Erst am Tag 10 nach Seneszenzinduktion wurden die Realtime-Glo™ Reagenzien wie oben beschrieben zu den Zellen gegeben und die erste Messung der emittierten Lichtmenge durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss daran wurden die seneszenten Zellen dem H₂O₂ in Endkonzentrationen von 0 µM (nur Wasser als Kontrolle), 100 µM, 200 µM bzw. 300 µM ausgesetzt, bevor die erneute Inkubation in den verschiedenen Temperaturregimes erfolgte. 20 Stunden nach Zugabe des Wasserstoffperoxids erfolgte eine erneute Messung der Lumineszenz. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels eines 2way ANOVA und einem Tukey's multiple comparisons test.

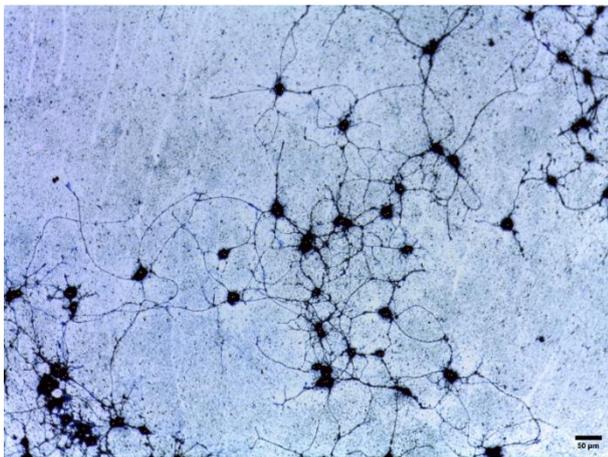
3 Ergebnisse

3.1 Messung der Zelldifferenzierung

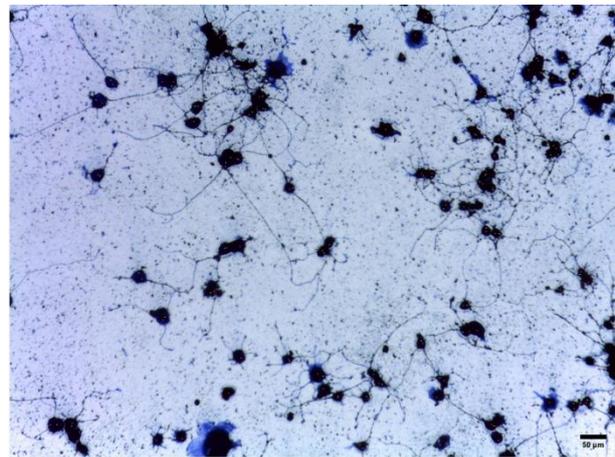
3.1.1 Vergleich der Neuritenausbildung und Zellkonnektivität mittels Coomassie-Färbung

In diesem Experiment wurden die Zellen inklusive der Zellfortsätze blau angefärbt, um die Differenzierung der Zellen der verschiedenen Bedingungen (in Bezug auf Neuritenausbildung und Konnektivität untereinander) zu untersuchen. Zur Operationalisierung der Zelldifferenzierung wurde bestimmt, wie groß in jeder experimentellen Bedingung der Anteil jener Zellen ist, welche Neuriten (Dendriten und Axone) ausbildeten, die länger sind als der Durchmesser des jeweiligen Zellkörpers.

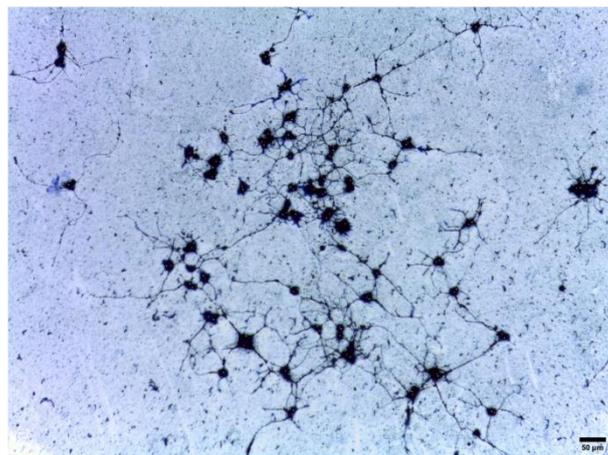
Bei jenen Zellen, auf die die o.g. Bedingung zutraf, wurde außerdem der Anteil der Zellen mit Konnektivität untereinander bestimmt.



c34 °C



c37 °C



cy 34/37 °C

Abbildung 10: Je ein Beispielbild zur Messung der Ausbildung von Neuriten und Konnektivität aus

jeder der drei Konditionen: konstant-37 (C37), konstant-34 (C34) und zyklisch (CY). Die Zellen wurden nach Anfertigung der Bilder klassifiziert nach Neuritenlänge größer/kleiner als Somadurchmesser und nach der Konnektivität zu anderen Zellen. Vergrößerung: 10-fach, Maßstabsbalken: 50µm

Es konnte gezeigt werden, dass in allen drei experimentellen Bedingungen die Mehrheit der Zellen Neuriten ausbildet, wodurch weiter bestätigt wird, dass die Seneszenzbehandlung der Zellen mit erniedrigtem Serumgehalt, LBH und 10-tägiger Alterung visuell zur Ausbildung eines neuronalen Phänotyps führt.

Für die statistische Analyse wurden 6 Ausreißer aus der zyklischen Gruppe und 3 Ausreißer aus der konstant-34°C- Gruppe entfernt, da die jeweiligen Fotos zu wenig Zellen zur Analyse aufwiesen, bzw. aufgrund des Artefaktreichtums (z.B. durch Farbstoffreste) eine solide Analyse verhinderten.

So hatten bei den Zellen, die konstant 37 °C ausgesetzt waren, im Durchschnitt 73,97 % der Zellen (95% KI: 70,69- 77,24%) Neuriten, die länger waren als der Durchschnitt des Somas, während dies bei den konstant-34°C-Zellen auf 84,67% (95% KI: 81,89 – 87,44%) und bei den zyklischen Bedingungen ausgesetzten Zellen auf 83,88% (95% KI: 80,61 – 87,14%) der Zellen zutraf.

Unter diesen Zellen ist der Anteil an Zellen mit Konnektivität zu anderen Zellen hoch. So hatten bei den Zellen, die konstant 37 °C ausgesetzt waren, im Durchschnitt 93,60% der Zellen (95% KI: 91,64 – 95,56%) Verbindungen zu anderen Zellen, während dies bei den konstant-34°C-Zellen auf 97,83 % (95% KI: 96,60 – 99,06%) und bei den zyklischen Bedingungen ausgesetzten Zellen auf 95,17% (95% KI: 93,63 – 96,71%) der Zellen zutraf. Der Kolmogorov-Smirnov-Test ergab eine Normalverteilung der Daten in allen drei Konditionen. Vergleicht man mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test die Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Bedingungen hinsichtlich der Ausbildung langer Neuriten, so zeigt bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der konstant-37 °C- und der konstant-34 °C-Gruppe (Mittlere Differenz -10,70 %, 95% KI: -15,64 - -5,759%, $p < 0,0001$). Zwischen konstant -37 und zyklisch beträgt der signifikante Unterschied im Mittel -9,908 % (95%KI: -15,15 – -4,667%, $p: 0,0001$) und zwischen konstant-34 °C und zyklisch statistisch nicht signifikante 0,792% (95%KI: -4,449 – 6,03%, $p: 0,285$).

Hinsichtlich der Unterschiede in der Zellkonnektivität fällt auf, dass sich wiederum die Zellen der konstant-37 °C - Gruppe von jenen der konstant-34 °C - Gruppe am stärksten und statistisch signifikant voneinander unterscheiden (MD -4,23%, 95%KI: -6,815 - -1,652, $p: 0,0005$). Zwischen konstant-37 °C und zyklisch besteht kein signifikanter Unterschied (MD -1,567%, 95%KI: -4,305 – 1,172, $p: 0,366$). Ebenso wenig besteht bei der Konnektivität ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der konstant-34 °C - Gruppe und der zyklischen Gruppe (MD 2,667%, 95%KI: -0,072 – 5,405, $p: 0,058$).

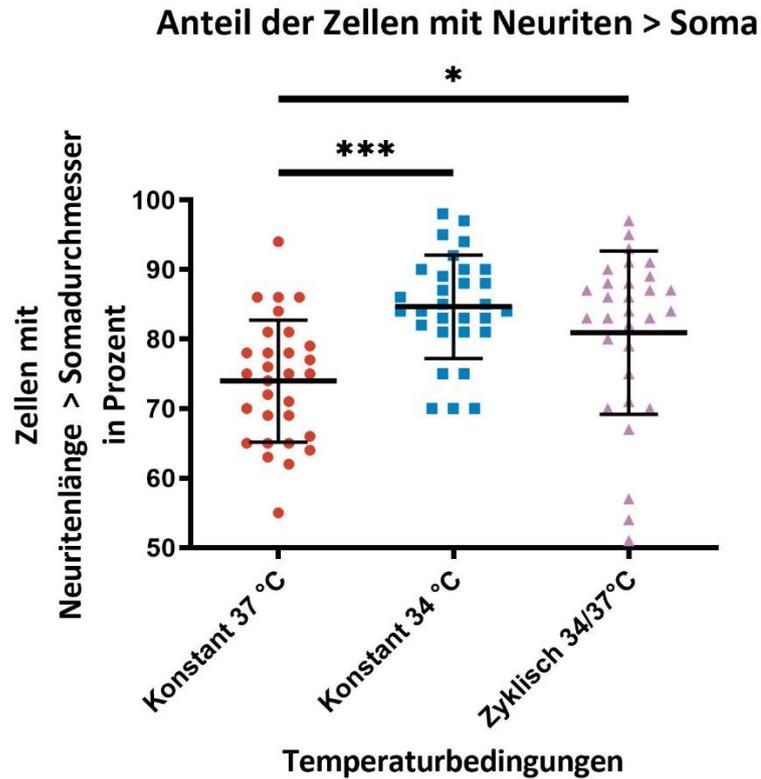


Abbildung 11: Dieser Graph zeigt den prozentualen Anteil jener Zellen, deren Neuritenlänge größer ist als der Somadurchmesser an der Gesamtzahl der Zellen, aufgeschlüsselt nach den drei experimentellen Temperaturbedingungen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Zu sehen ist ein signifikant geringerer Anteil an Zellen mit langen Neuriten in der Konstant-37°C-Bedingung im Vergleich zu den anderen beiden Bedingungen.

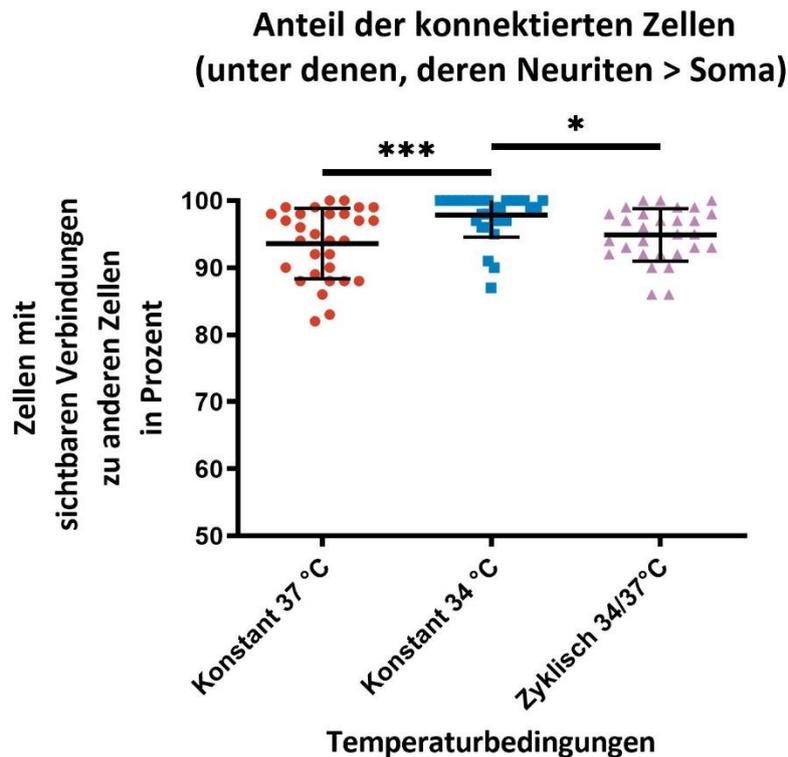


Abbildung 12: Dieser Graph zeigt den prozentualen Anteil jener Zellen, die mit ihren Neuriten eine sichtbare Verbindung zu anderen Zellen eingegangen sind an der Gesamtzahl der Zellen, aufgeschlüsselt nach den drei experimentellen Temperaturbedingungen. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Es zeigt sich eine signifikant bessere Konnektivität in den Zellen unter Konstant-34°C- Bedingungen im Vergleich zu den anderen beiden Temperaturbedingungen.

3.1.2 Messung der Expressierung neuronenspezifischer Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung

In diesem Experiment wurde eine Immunfluoreszenzfärbung neuronenspezifischer Proteine (Schwere Kette des Neurofilaments sowie beta-III-Tubulin) vorgenommen, um einen Hinweis auf den Differenzierungsgrad der Zellen zu erlangen. Dazu wurden zunächst pro experimenteller Bedingung und angefärbtem Protein mit einem Fluoreszenzmikroskop 8 Bilder mit je ca. 15-25 abgebildeten Neuroblastomzellen angefertigt. Dabei zeigte sich, dass die Anfärbbarkeit der Neuriten mittels beta-III-Tubulin deutlich intensiver imponierte als mittels NFH. Die Neuritenanzahl und -Länge entsprach etwa jener in den mit Coomassie gefärbten Zellen (siehe Abschnitt 3.1.1).

Die Auswertung der Bilder durch zwei unabhängige Betrachter unter Verblindung ergab, dass zwischen konstant-37 °C, konstant-34 °C und zyklisch-34/37 °C keine Unterschiede in der Anfärbungsintensität bestanden und daher von einer ähnlich starken Expressierung der neuronenspezifischen Proteine Schwere Kette des Neurofilaments und Klasse III β -Tubulin

in den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen ausgegangen werden muss.

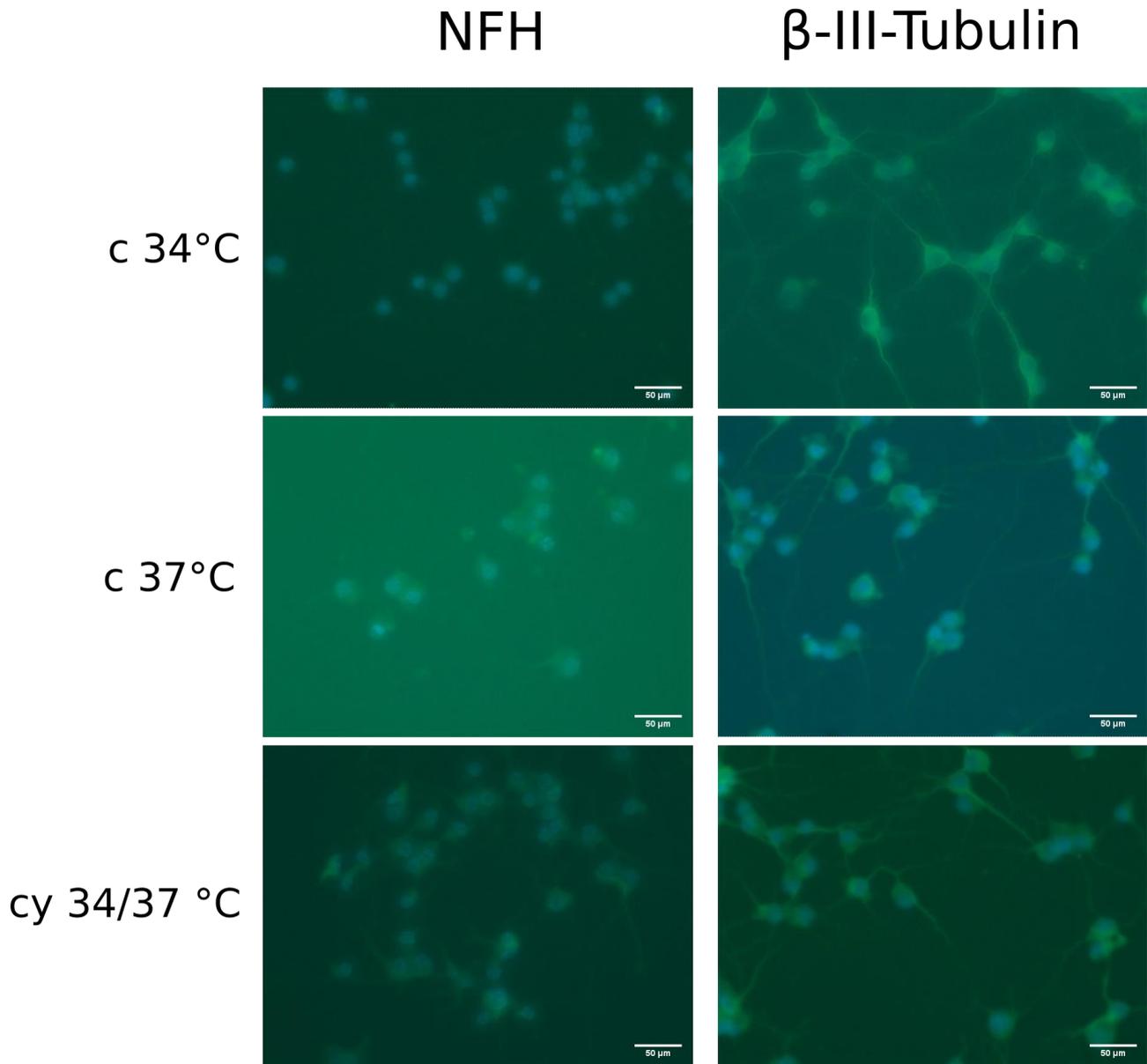


Abbildung 13: Beispielhafte Bilder zur Beurteilung der Expressierung neuronenspezifischer Proteine unter den verschiedenen Temperaturbedingungen: In der linken Spalte wurde die Schwere Kette des Neurofilaments (NFH) angefärbt, rechts das beta-III-Tubulin. Diese Untersuchung erlaubt nur eine semiquantitative Auswertung. Bei der Begutachtung durch zwei verblindete Untersucher konnten keine Unterschiede in der Anfärbung neuronenspezifischer Proteine festgestellt werden. Vergrößerung jeweils 40-fach, Maßstabsbalken 50 μ m

3.2 Messung der Überlebensfähigkeit seneszenten Zellen

3.2.1 Bestimmung der Sensitivität des MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assays und des MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assays

In diesem Experiment sollte die Überlebensfähigkeit der Zellen über die Zeit hinweg durch die Zugabe verstoffwechselbarer Substrate mit konsekutiver fluoreszenter Anregbarkeit bzw. Lichtemission bestimmt werden. Trotz wiederholter Versuche konnte mit den MultiTox-Assays keine verlässliche Quantifizierung des Verhältnisses zwischen lebenden und toten Zellen erreicht werden. Dem MultiTox Fluor Assay zufolge zeigten die mit Digitonin behandelten Zellen im Vergleich zur mit Wasser behandelten Kontrollgruppe eine höhere Aktivität der Protease, die nur in lebenden Zellen vorkommen soll und gleichzeitig eine hohe Aktivität jener Protease, die zerstörte Zellen verlässlich anzeigen soll. Im Fall des MultiTox-Glo-Assays zeigte sich zwischen Digitonin- und Kontrollgruppe zwar ein deutlicher Unterschied bei der Anzeige der Zytotoxizität, jedoch keiner bei der Zellviabilität. Dieses Ergebnis trat konsistent bei Zellzahlen von 600 - 10.000 ausgesäten Zellen pro Well auf. Aufgrund der Implausibilität dieser Ergebnisse wurde auf eine weitere Analyse der Zytotoxizität bzw. Zellviabilität mittels der MultiTox-Assays verzichtet.

3.2.2 Bestimmung der Assay-Linearität des RealtimeGlo-Assays in Abhängigkeit der Zellzahl

Wie bereits erwähnt beruht dieser Luciferase-Assay auf dem Prinzip, dass nur metabolisch aktive (und damit lebendige) Zellen in der Lage sind, das zugegebene Prosubstrat so zu verstoffwechseln, dass es mit der Luciferase reagiert und es zu einer Lichtemission kommt. Aus dem Maß an Lichtemission (Lumineszenz) lässt sich daher auf die Anzahl lebendiger Zellen schließen. Zunächst wurde die Linearität des Assays in Bezug auf die Zellkonzentration bestimmt, um in der Folge valide Daten zur Überlebensfähigkeit der Zellen unter verschiedenen Bedingungen generieren zu können. Es zeigt sich, dass die Lichtemission bei allen untersuchten Zellkonzentrationen grundsätzlich den gleichen Verlauf nimmt, bei dem der Höhepunkt der Lumineszenz nach 2-5 Stunden erreicht ist und die Lichtemission anschließend langsam linear fällt.

Ebenso zeigt sich, dass es zwar auch in Wells ohne Zellen zu einer Lichtemission kommt, dass diese sich jedoch quantitativ deutlich von der Emission in Wells mit Zellen unterscheidet. Darüber hinaus besteht ein deutlicher, linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Zellen und der Lumineszenz. Eine Ausnahme scheint hier die Lichtemission bei einer Zellzahl von 5000 Zellen pro Well zu sein, bei der es zu deutlich höheren Emissionen kommt als bei Zellkonzentrationen von 10.000 oder 20.000 Zellen pro Well.

Lumineszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Well

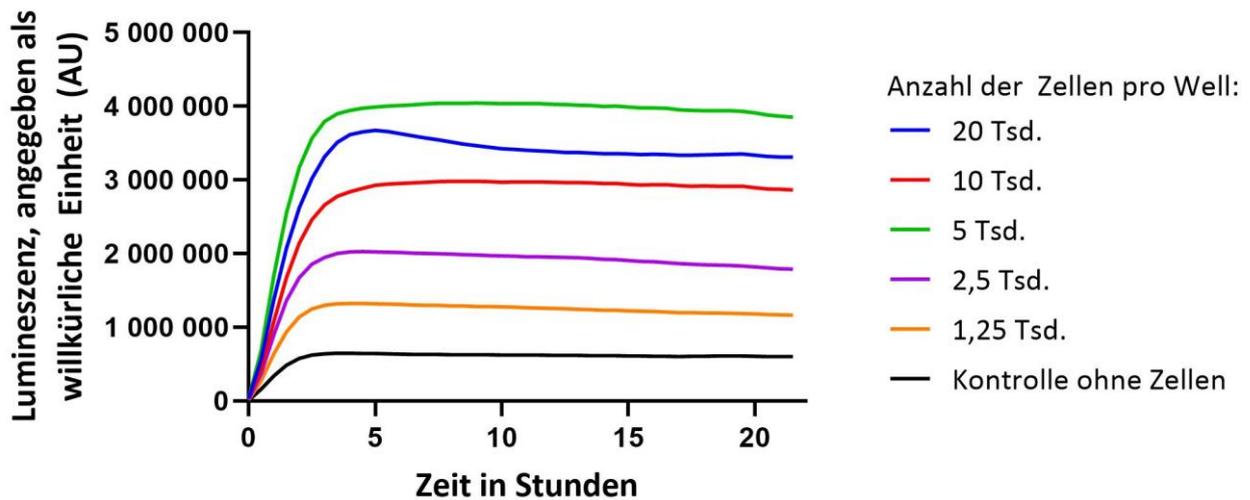


Abbildung 14: Vor der Durchführung der Experimente zur Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeitsmessung der Zellen mittels des Promega RealtimeGlo-Assays wurde die Linearität des Assays in Abhängigkeit von der Zellzahl überprüft. Hier dargestellt ist die Lumineszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl (angegeben in „willkürlichen Einheiten“ bzw. „arbitrary units“ (AU)). Es zeigt sich - bis auf die außergewöhnlich hohe Lichtemission bei 5 Tsd. Zellen pro Well) ein linearer Zusammenhang (höhere Lichtemission mit steigender Zellzahl) und eine stabile Emission über die Zeit hinweg. Dies ist plausibel, da eine höhere Zellzahl in diesem Assay mit einer stärkeren Verstoffwechslung des Prosubstrats und daher zu mehr Reaktionsprodukten mit der Luciferase und infolgedessen zu einer höheren Lichtemission führt.

3.2.3 Bestimmung der optimalen Zelldichte seneszenten Zellen

Die mikroskopische Überprüfung der Zelldichte ergab eine optimale Zelldichte von 2500 Zellen/Well bei der Aussaat. Bei dieser Dichte waren die Zellen weit genug voneinander entfernt, um eine Überlagerung (und damit spätere Auswertung) zu verhindern und nahe genug beieinander, um auch 10 Tage nach Seneszenzinduktion noch ausreichend lebende Zellen pro Well vorzufinden. Morphologisch zeigte sich bei dieser Konzentration eine Abflachung und Ausbildung von Dendriten und Axonen.

3.2.4 Bestimmung der Metabolisierungs- / bzw. Überlebensfähigkeit mittels des RealtimeGlo Assays

Zur Messung der Überlebensfähigkeit wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, in welchen mittels Promega RealtimeGlo die Metabolisierungsrate der Zellen über 11 Tage nach der Seneszenzinduktion hinweg gemessen wurde.

Um das Ergebnis durch unterschiedliche Zelldichten in den einzelnen Wells nicht zu verzerren, wurden zur statistischen Auswertung die absoluten Werte der Lichtemission

vom ersten Tag der Messung (Tag 4 nach Seneszenzinduktion) auf 100% gesetzt (normalisiert) und die folgenden Lichtemissionswerte in Relation zum Wert am Tag 4 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte schließlich mittels eines 2way ANOVA und einem Tukey's multiple comparisons test zwischen den drei verschiedenen Temperaturbedingungen.

Betrachtet man alle drei Experimente zusammengefasst, so zeigt sich, dass bei allen Zellen im Zeitverlauf ein Rückgang der Lichtemission auf 48 % - 65 % des Ausgangswertes zu verzeichnen war. Es war insgesamt kein statistisch signifikanter Unterschied in der Überlebensfähigkeit zwischen den drei experimentellen Bedingungen feststellbar (siehe auch Abbildung 15). Die berechneten Zahlenwerte sind in Tabelle 2 beispielhaft für Tag 7 und 11 angegeben.

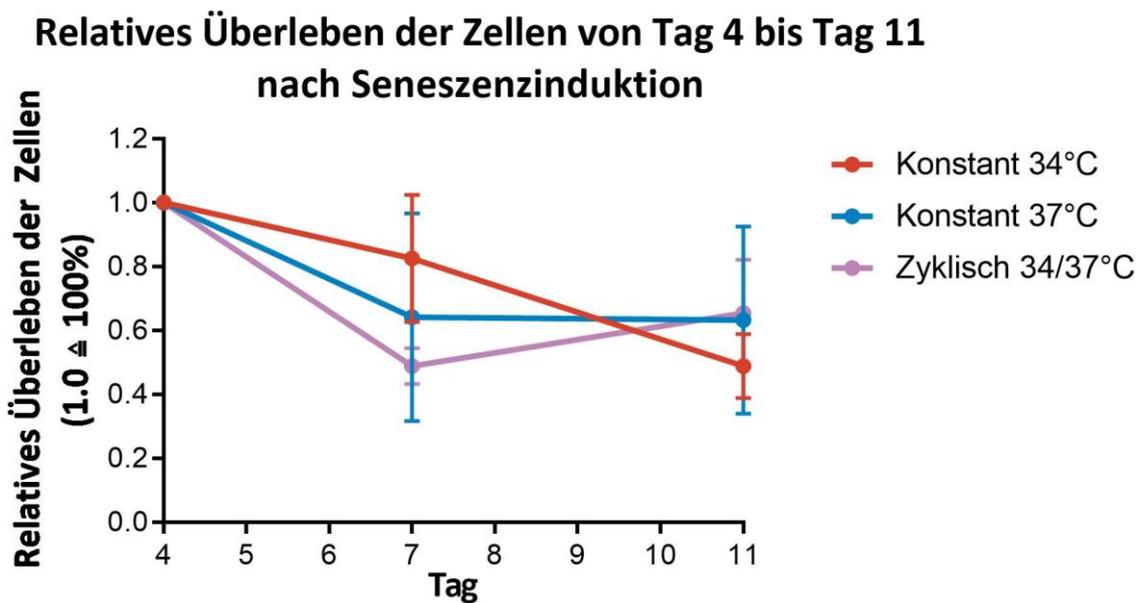


Abbildung 15: Mittels des RealtimeGlo-Assays wurde die Lumineszenz (und damit die Überlebensfähigkeit) der gealterten Zellen bestimmt. Grafisch dargestellt ist das relative Überleben 7 und 11 Tage nach Seneszenzinduktion unter verschiedenen Temperaturbedingungen in Bezug auf den Wert von Tag 4, welcher jeweils 100% entspricht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der basalen Überlebensfähigkeit der unter verschiedenen Temperaturbedingungen gehaltenen Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Tabelle 6: Statistische Auswertung der Überlebensfähigkeit (quantifiziert mittels dem Promega RealtimeGlo-Assay) 7 und 11 Tage nach Seneszenzinduktion

Tukey's multiple comparisons test	Mittlere Differenz	95,00% KI der Differenz	Korrigierter p-Wert
Tag 7			
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	0,1840	-0,6819 - 1,050	0,7079
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	0,3375	-0,2711 - 0,9461	0,1633
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	0,1535	-0,9046 - 1,212	0,7355
Tag 11			
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	-0,1439	-1,0100 - 0,7223	0,7312
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,1665	-0,6124 - 0,2793	0,4057
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,02260	-0,8078 - 0,7626	0,9926

3.3 Messung der Überlebensfähigkeit seneszenten Zellen unter Bedingungen oxidativen Stresses

Zur Messung der Überlebensfähigkeit unter oxidativem Stress wurde 10 Tage nach Seneszenzinduktion und Inkubation unter den unterschiedlichen Temperaturbedingungen die Promega RealtimeGlo- Reagenz zu den Zellen gegeben. Im Anschluss daran wurde eine erste Messung der Lichtemission vorgenommen, um die basale Metabolisierungsrate zu ermitteln. Daraufhin wurde Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in aufsteigender Konzentration zu den Zellen gegeben. Nach 20stündiger Inkubation unter den jeweiligen Temperaturbedingungen wurde eine erneute Messung der Lichtemission vorgenommen. Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt. Weitere Versuche der Wiederholung des Experiments scheiterten an einer ausgeprägten generellen Zunahme der Sterblichkeit der Zellen über alle Temperaturbedingungen hinweg, sodass bei den Folgeexperimenten keine statistische Auswertung vorgenommen werden konnte. Da die erhöhte Sterblichkeit auch bei jenen Zellen festgestellt wurde, die nicht mit Wasserstoffperoxid behandelt worden waren, wurde von einer generellen Viabilitätsreduktion ohne direkten Zusammenhang mit den Experimenten ausgegangen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines 2way ANOVA und einem Tukey's multiple comparisons test zwischen den drei verschiedenen Temperaturbedingungen. Diese Experimente zeigten übereinstimmend, dass kein signifikanter Unterschied in der Überlebensfähigkeit der Zellen besteht, wenn diese keinem (0 µM H₂O₂) oder zu starkem (300 µM H₂O₂) oxidativem Stress ausgesetzt sind. Ohne oxidativen Stress beträgt die Lichtemission im Mittel zwischen 72 % und 84 % des Ausgangswertes vom Vortag. Nach der Zugabe von 300 µM H₂O₂ ist aufgrund des ausgedehnten Zelltodes keine über das Hintergrundrauschen hinausgehende Lichtemission mehr feststellbar.

Große Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der Zellen zeigten sich allerdings bei den

mittelhohen Konzentrationen von 100 μM und 200 μM H_2O_2 .

In beiden, unabhängig voneinander durchgeführten, Experimenten zeigte sich eine bessere Überlebensfähigkeit jener Zellen, die zyklischen Temperaturbedingungen ausgesetzt waren, im Vergleich zu jenen, die mit konstant 34°C oder 37°C inkubiert worden waren.

Der Unterschied in der relativen Lichtemission im ersten Experiment betrug nach der Zugabe von 100 μM H_2O_2 im Mittel 30,05 % (95%KI: 16,97 - 43,13%, p: <0,0001) für zyklisch vs. konstant 34°C, bzw. 21,97 % (95%KI: 8,90 – 35,05 %, p<0,001) für zyklisch vs. konstant 37°C. Bei 200 μM H_2O_2 betrug der Unterschied für zyklisch vs. konstant 34 °C noch 23,79% (95%KI: 10,71 – 36,87 %, p:0,0004) und für zyklisch vs. konstant 37°C 23,98% (95%KI: 10,90 – 37,05 %, p:0,0003)

Die Unterschiede, die im zweiten Experiment festgestellt wurden, waren – wegen zweier Ausreißer – zum größten Teil nicht statistisch signifikant. Hier zeigte sich nach Zugabe von 100 μM H_2O_2 bei den Zellen zyklisch vs. konstant 34°C eine Differenz in der Lichtemission von 16,00 % (95%KI: 5,42 -37,42 %, p: 0,9868 und bei zyklisch vs. konstant 37°C eine Differenz von 17,33% (95%KI: 4,09-38,75 %, p:0,1288)

Nach Zugabe von 200 μM H_2O_2 wurde eine Differenz von 31,00% (95%KI: 9,58 – 52,42 %, p:0,0038) zwischen den Bedingungen zyklisch und konstant 34°C festgestellt.

Zwischen den Bedingungen zyklisch und konstant 37°C in der Kondition mit 200 μM H_2O_2 war der Unterschied aufgrund zweier Ausreißer statistisch nicht signifikant. Er betrug im Mittel 16,00% (95%KI: 5,42 - 37,42 %, p: 0,1705). Die genauen Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im Folgenden aufgeführt:

Überleben der Zellen unter oxidativem Stress, 1. Experiment

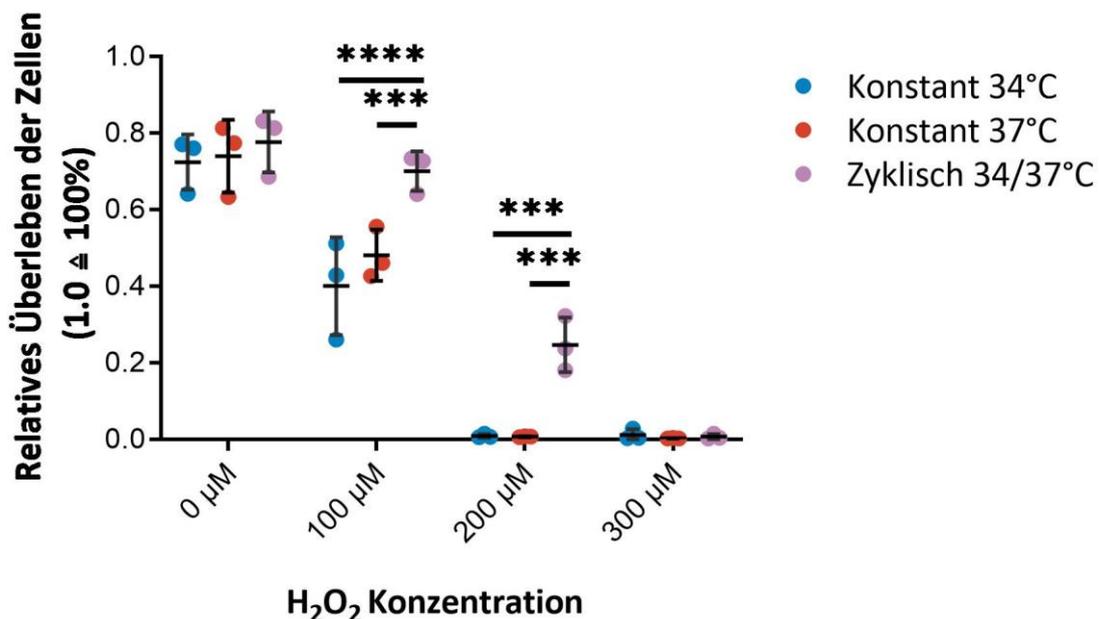


Abbildung 16: In diesem Graphen ist das relative Überleben der verschiedenen Temperaturbedingungen ausgesetzten Zellen unter Bedingungen von oxidativem Stress (jeweils 20 Stunden nach Zugabe von Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Konzentrationen) zu sehen. Die

Überlebensfähigkeit wurde anhand der Lichtemission der Zellen (Promega RealtimeGlo Assay) bestimmt. Dabei zeigte sich ein hochsignifikant besseres Überleben jeder Zellen, die zyklischen Temperaturbedingungen ausgesetzt waren im Vergleich zu den Zellen unter konstanten Temperaturbedingungen. 1.0 bzw. 100% entspricht der Lichtemission vor der Zugabe von Wasserstoffperoxid. Die Daten wurden in einem Experiment gewonnen.

Überleben der Zellen unter oxidativem Stress, 2. Experiment

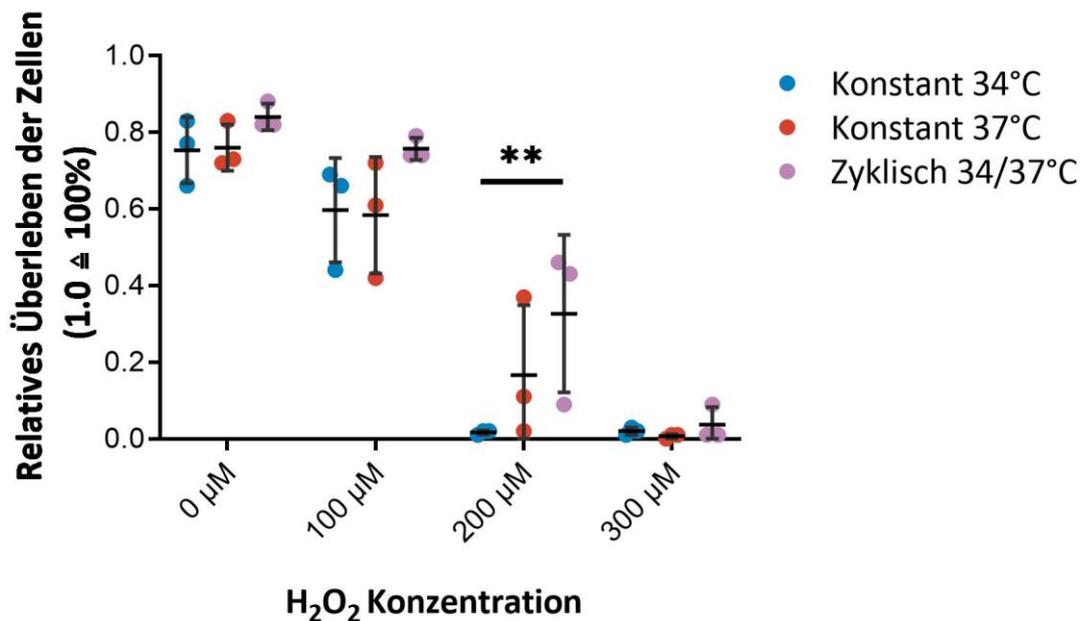


Abbildung 17: In diesem Graphen ist das Ergebnis des zweiten Experiments zu sehen. Untersucht wurde wieder das relative Überleben der verschiedenen Temperaturbedingungen ausgesetzten Zellen unter Bedingungen von oxidativem Stress (jeweils 20 Stunden nach Zugabe von Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Konzentrationen). Die Überlebensfähigkeit wurde anhand der Lichtemission der Zellen (Promega RealtimeGlo Assay) bestimmt. Dabei zeigte sich ein besseres Überleben jeder Zellen, die zyklischen Temperaturbedingungen ausgesetzt waren im Vergleich zu den Zellen unter konstanten Temperaturbedingungen. Signifikant ist das Ergebnis in diesem Experiment aufgrund von Ausreißern nur im Vergleich Zyklisch vs. Konstant 34°C. 1.0 bzw. 100% entspricht der Lichtemission vor der Zugabe von Wasserstoffperoxid. Die Daten wurden in einem Experiment gewonnen.

Tabelle 7: Unterschiede in der Überlebensfähigkeit (quantifiziert mittels dem Promega RealtimeGlo-Assay) unter oxidativem Stress, 1. Experiment

Tukey's multiple comparisons test	Mittlere Differenz	95,00% KI der Differenz	Signifikanz	Korrigierter P-Wert
0 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	-0,01591	-0,1467 - 0,1149	ns	0,9505
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,05266	-0,1834 - 0,07812	ns	0,5805
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,03675	-0,1675 - 0,09403	ns	0,7648
100 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	-0,08075	-0,2115 - 0,05003	ns	0,2898
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,3005	-0,4313 - -0,1697	****	<0,0001
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,2197	-0,3505 - -0,08897	***	0,0009
200 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	0,001837	-0,1289 - 0,1326	ns	0,9993
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,2379	-0,3687 - -0,1071	***	0,0004
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,2398	-0,3705 - -0,1090	***	0,0003
300 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	0,008967	-0,1218 - 0,1397	ns	0,9840
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	0,004565	-0,1262 - 0,1353	ns	0,9958
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,004403	-0,1352 - 0,1264	ns	0,9961

Tabelle 8: Unterschiede in der Überlebensfähigkeit unter oxidativem Stress (quantifiziert mittels dem Promega RealtimeGlo-Assay), 2. Experiment

Tukey's multiple comparisons test	Mittlere Differenz (LS)	95,00% CI of diff,	Signifikanz	Korrigierter p-Wert
0 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	-0,006667	-0,2208 - 0,2075	ns	0,9967
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,08667	-0,3008 - 0,1275	ns	0,5775
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,08000	-0,2942 - 0,1342	ns	0,6253
100 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	0,01333	-0,2008 - 0,2275	ns	0,9868
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,1600	-0,3742 - 0,05418	ns	0,1705
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,1733	-0,3875 - 0,04085	ns	0,1288
200 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	-0,1500	-0,3642 - 0,06418	ns	0,2082
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,3100	-0,5242 - 0,09582	**	0,0038
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,1600	-0,3742 - 0,05418	ns	0,1705
300 μM				
Konstant 34°C vs. Konstant 37°C	0,01333	-0,2008 - 0,2275	ns	0,9868
Konstant 34°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,01667	-0,2308 - 0,1975	ns	0,9794
Konstant 37°C vs. Zyklisch 34/37°C	-0,03000	-0,2442 - 0,1842	ns	0,9350

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hinweise zur Klärung der Frage zu finden, ob ein Zusammenhang zwischen circadianen Störungen und neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen besteht. Hierfür wurde das Proteom, die Differenzierungsfähigkeit, das Überleben und die Resistenz gegenüber oxidativem Stress von murinen Nervenzellen untersucht, bei welchen zuvor ein künstlicher Alterungsprozess (Seneszenz) angestoßen worden war. In der hier vorgelegten Arbeit konnte nicht belegt werden, dass ein starkes Zeitgebersignal zu ausgeprägten Veränderungen der Zelldifferenzierung führt. Auch die basale Überlebensrate blieb hiervon unbeeinflusst. Ein anderes Bild zeigte sich, als die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Hierbei traten deutliche Unterschiede in der Resistenz gegenüber Sauerstoffradikalen auf, wobei jene Zellen, die zyklischen Temperaturbedingungen ausgesetzt waren – also ein starkes Zeitgebersignal erhielten – deutlich höhere Überlebensraten zeigten als Zellen mit einer konstanten Umgebungstemperatur.

Zusammen mit den zuvor am selben Institut durchgeführten Arbeiten von Nora Rubbe, die zeigen konnte, dass es durch zyklische Temperaturbedingungen in N2a- Zellen auch zu Veränderungen in der Zusammensetzung und/oder Aggregation von Proteinen kommt, weisen diese Ergebnisse auf eine wichtige Rolle circadianer Störungen in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen hin. Darüber hinaus haben die hier vorgestellten Ergebnisse große Implikationen für die Durchführung von Zellkulturstudien im Allgemeinen.

4.2 Grundsätzliche Schwächen und Stärken der vorgelegten Studie

Es ist dem Autor dieser Schrift nicht entgangen, dass es widersprüchlich ist, einleitend eine Fundamentalkritik an reduktionistisch-mechanistischen Erklärungsmustern zu üben, und anschließend die komplexen, unverstandenen Vorgänge der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen auf extrem simplifizierende Weise in einer Zellkultur von Mäuse-Neuroblastomzellen nachvollziehen zu wollen.

Schließlich stammen die Nervenzellen in unseren Gehirnen weder von einem Mäuseneuroblastom, noch befinden sie sich vom Rest des Körpers isoliert in einer Plastikflasche. Sie altern physiologischerweise über Jahrzehnte hinweg und nicht innerhalb weniger Tage aufgrund der Behandlung mit Histondeacetylaseinhibitoren und einer Reduktion des Kälberserumanteils im sie umgebenden Medium. Darüber hinaus existiert in unserem Nervensystem keine Nervenzelle in Isolation, wie in der Kulturflasche, sondern ist stets mit einer Vielzahl von anderen Nerven- und Gliazellen verbunden und tauscht darüber hinaus beständig Hormonsignale mit dem Rest des Körpers aus.

Es ist daher offensichtlich, dass die unmittelbare Aussagekraft der hier vorgestellten

Experimente für klinische Fragestellungen und die konkrete therapeutische Anwendung sehr gering sein muss.

Dennoch können die Experimente – gerade wegen ihrer Einfachheit – dem Erkenntnisfortschritt dienen. Ein reduktionistischer Ansatz wie der hier vorgenommene erlaubt schließlich, die Zahl möglicher Einflussfaktoren gering zu halten. Anders als bei Tierexperimenten oder gar epidemiologischen Studien ist die Zahl von Variablen, die sich auf das Ergebnis verzerrend auswirken können, in einer Zellkulturarbeit vergleichsweise gering. Die Stärke einer solchen Arbeit kann demnach nicht in ihrer möglichst großen Realitätsnähe liegen, sondern ist vielmehr in einer Art „proof of principle“ zu finden. Die so gewonnenen Erkenntnisse können demnach den Anstoß für weitere Untersuchungen in komplexeren Modellsystemen oder mit epidemiologischen Mitteln liefern. Darüber hinaus ermöglicht die vergleichsweise einfache, schnelle und kostengünstige Durchführbarkeit der Experimente die problemlose Wiederholung durch andere Forschende zur Überprüfung der Replizierbarkeit und ist im Vergleich zu tierexperimentellen Studien ethisch weitgehend unbedenklich.

Es muss festgestellt werden, dass die Fachliteratur und Forschungskultur zu neurodegenerativen Erkrankungen immer noch stark auf die Proteinaggregatshypothese fokussiert ist.¹⁶¹ Entsprechend werden auch Zellkulturarbeiten in diesem Feld häufig dazu genutzt, die Genexpression, die Akkumulation oder den Abbau von Amyloid β , tau oder α -Synuclein besser zu verstehen. Die vorliegende Arbeit beschreitet hier andere Wege, weil sie viel grundsätzlichere Prozesse in den Blick nimmt. Differenzierung, Überleben und Stressresistenz sind schließlich für die Zellen aller Lebewesen von zentraler Bedeutung, ebenso wie die zeitliche Synchronizität mit ihrer belebten und unbelebten Mitwelt.

Es ist demnach vor allem die Perspektive, welche diese Arbeit von den meisten anderen Forschungsarbeiten zum Thema Neurodegeneration unterscheidet.

4.3 Die einzelnen Ergebnisse im Kontext bisheriger Erkenntnisse

4.3.1 Analyse des Proteingehalts und des Proteoms

Eine detaillierte Analyse des Proteingehalts und des Proteoms der unterschiedlich behandelten Zellen konnte bis zur Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden.

4.3.2 Messung der Zelldifferenzierung

Die Differenzierungsfähigkeit der Zellen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen wurde sowohl anhand morphologischer Kriterien wie der Ausbildung von Neuriten, als auch anhand der Expressierung von neuronenspezifischen Proteinen (β -Tubulin und NFH) überprüft.

Hintergrund für dieses Experiment ist die vielfach beschriebene Beobachtung, dass es bei der physiologischen Alterung von Nervenzellen in Wirbeltieren - und verstärkt beim Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen – zu einer Reduktion der Anzahl von Axonen,

Dendriten und damit auch Synapsen kommt. Dies zeigt sich vor allem im Verzweigungsgrad und die Dichte der Ausbildung von dendritischen Dornen sowie eine Reduktion in der Konnektivität.²⁴⁷⁻²⁴⁹ In einigen Forschungsergebnissen der letzten Jahre konnte *in vivo* wie *in vitro* ein ausgeprägter circadianer Einfluss auf die Neuritenausbildung, Synaptogenese und synaptische Plastizität festgestellt werden, sodass es zielführend schien, auch in dem hier vorgestellten experimentellen Setting eine Untersuchung der Neuritenausbildung, Konnektivität und Exprimierung neuronenspezifischer Proteine zu untersuchen.^{250,251,251,252}

Bezüglich der reinen Ausbildung von Neuriten und der Konnektivität der Zellen untereinander, wiesen jene Zellen, die konstant 34° C ausgesetzt waren und die Zellen in zyklischen Temperaturbedingungen eine signifikant stärkere Neuritenausbildung auf als die Zellen, die konstant 37 °C ausgesetzt waren. Bei der Konnektivität fielen die Unterschiede geringer aus, es zeigte sich nur zwischen den Konstant-34°C-Zellen und den Konstant-37°C-Zellen eine signifikant unterschiedliche Konnektivität. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 11 und Abbildung 12 zusammengefasst.

Diese Unterschiede weisen am ehesten auf eine Temperaturabhängigkeit der Neuritenausbildung und Konnektivität hin, wobei eine niedrigere (Durchschnitts-)Temperatur mit einer stärkeren Neuritenbildung und Konnektivität einherzugehen scheint. Eine differenzierungsfördernde Wirkung der zyklischen Temperaturbedingungen konnte hier also nicht bestätigt werden. Eher scheint die niedrigere Temperatur für die N2a-Zelldifferenzierung vorteilhaft zu sein. Dies würde mit Befunden übereinstimmen, die zeigen, dass eine Hyperthermie sich negativ auf die zelluläre Gesundheit von Neuronen auswirkt und beispielsweise Apoptose induzieren kann.²⁵³ Allerdings sind auch gegenteilige Effekte beschrieben, da andere Studien zeigen, dass eine milde Hyperthermie die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen fördern kann, sodass durchaus widersprüchliche Befunde vorliegen.^{254,255}

Bei der Anfärbung neuronenspezifischer Proteine konnte kein Unterschied zwischen den Zellen, welche konstanten Temperaturbedingungen ausgesetzt waren, und jenen mit zyklisch wechselndem Temperaturverlauf gefunden werden. Eine genauere Auswertung dieses semiquantitativen Tests erfolgte nicht mehr, da zwei verblindete Begutachtende keine Unterschiede in der Intensität der Färbung feststellen konnten. Auf die Verwendung anderer Auswertungsmethoden (z.B. durch eine exaktere, technische Bestimmung des Anfärbungsgrads oder durch die Anfärbung anderer Proteine) wurde verzichtet, da dies den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte, insbesondere da nach Betrachtung der Bilder nicht von einem ausgeprägten Unterschied ausgegangen werden konnte. Die ursprünglich zusätzlich geplante Analyse des Proteoms der Zellen könnte noch aussagekräftigere und besser quantifizierbare Hinweise auf den Differenzierungsgrad der Zellen liefern, auch weil hier viel mehr als nur die zwei verschiedenen, neuronenspezifischen Proteine mit einbezogen wären.

Natürlich schließen diese Ergebnisse einen Einfluss circadianer Störungen auf die Funktionsweise von Neuronen nicht aus, da die Ausbildung von Neuriten und die Exprimierung von neuronenspezifischen Proteinen zwar eine notwendige, aber keinesfalls hinreichende Bedingung für die Funktionsfähigkeit von Nervenzellen darstellt. Auf die

Funktionsfähigkeit der Zellen kann aus diesen Experimenten daher nicht geschlossen werden.

4.3.3 Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit mittels Promega RealTime-Glo

Um die generelle Überlebensfähigkeit der seneszenten Zellen unter den unterschiedlichen Bedingungen zu eruieren, wurde deren Fähigkeit zur Verstoffwechslung eines Luziferase-Prosubstrats bestimmt und die Lichtemission der Zellen gemessen. Während das Promega-RealTime-Glo- Präparat, anders als das häufig verwendete Tetrazoliumchlorid, mangels Toxizität eine kontinuierliche und wiederholte Messung ermöglicht, ist es problematisch, dass die genaue Zusammensetzung – und damit auch die Wirkweise – des Assays nicht öffentlich zugänglich ist.

Nimmt man diese Einschränkungen hin, so zeigte sich bei den Voruntersuchungen, dass die Lichtemission tatsächlich mit steigender Zellzahl zunimmt. Bei einer Zelldichte von mehr als 5000 Zellen pro Well zeigte sich eine Abnahme der Lichtemission, was auf eine dann möglicherweise nicht mehr ausreichende Nährstoffzufuhr der Zellen zurückzuführen ist.

Bei der Untersuchung der Überlebensfähigkeit unter den verschiedenen Temperaturbedingungen zeigte sich, dass die Lichtemission über die Zeit hinweg generell in allen drei experimentellen Gruppen abnimmt, jedoch zwischen den verschiedenen Zellpopulationen keine klaren Unterschiede in der Lichtemission und - daraus abgeleitet - der Überlebensfähigkeit festgestellt werden konnten.

Es scheint daher so, als würden sich die unterschiedlichen Temperaturbedingungen – zumindest in den ersten 11 Tagen nach Seneszenzinduktion - nicht unmittelbar auf die grundlegende Überlebensfähigkeit der Zellen auswirken.

Allerdings muss bei der Interpretation dieses Ergebnisses auch berücksichtigt werden, dass auch die unter konstanten Temperaturbedingungen gehaltenen Zellen durchaus unvermeidlicherweise Zeitgebersignalen ausgesetzt werden. So ist es zum Mediumwechsel unumgänglich, die Zellen aus den Inkubatoren zu nehmen, was bereits einen Temperaturreiz darstellt. Außerdem wurde auch durch den regelmäßigen Mediumwechsel selbst ein Reiz gesetzt, der – aufgrund der regelmäßig wiederkehrenden Veränderungen im Nährstoff- und Hormongehalt - als Zeitgeber fungiert.^{256,257}

Da die Lumineszenz am Ende der Messperiode in allen Gruppen mit Durchschnittlich 49-65 % im Vergleich zum Ausgangswert noch relativ hoch war, stellt sich auch die Frage, ob bei einer Verlängerung des Experiments um einige Tage deutlichere Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen auftreten würden. Der beständigste Risikofaktor für die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen ist schließlich nach wie vor das Alter, sodass spekuliert werden kann, dass auch bei den hier verwendeten, seneszenten N2a-Zellen der Einfluss schädigender Faktoren über die Zeit hinweg zunimmt und ein eventuell vorhandener protektiver Effekt des starken Temperatur-Zeitgeber-Signals dann stärker hervortreten könnte. Hinweise darauf zeigen sich auch durch die Ergebnisse bei der Induktion von oxidativem Stress durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid zu den Zellen.

4.3.4 Messung der Metabolisierungs- bzw. Überlebensfähigkeit mittels Promega RealTime-Glo unter Bedingungen oxidativen Stresses

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, scheint oxidativer Stress eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen zu spielen. Eine Fülle an Studien hat in den letzten Jahren die Relevanz der oxidativen Homöostase für die Aufrechterhaltung der Gesundheit von Nervenzellen hervorgehoben und darauf hingewiesen, dass es neben einer gewissen genetischen Prädisposition vor allem Toxine, (chronische) Inflammation und metabolische Faktoren sind, welche diese aus dem Gleichgewicht bringen können und somit die Gefahr für oxidativen Stress erhöhen.²⁵⁸ Ebenso wurde bereits im Abschnitt 1.5 darauf hingewiesen, dass die ROS-Homöostase auf ein adäquates Timing durch das circadiane System angewiesen ist und dass auch Entzündungsprozesse sowie der Metabolismus stark circadian reguliert werden. Daher schien es angemessen, die Metabolisierungs- und Überlebensfähigkeit der Zellen unter Bedingungen zu testen, die durch Zugabe von Wasserstoffperoxid eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) simulieren.

Während sich die Zellen der drei experimentellen Gruppen in ihrem basalen Überleben ohne oxidativen Stress nicht voneinander unterschieden (worauf ja bereits die Ergebnisse vom Abschnitt 3.2.4 hindeuten), zeigten sich deutliche Unterschiede in der Resistenz der Zellen gegenüber ROS. So zeigte sich, dass die Zellen, die einem starkem Zeitgebersignal ausgesetzt waren, oxidativen Stress deutlich besser kompensieren konnten und höhere Metabolisierungs- bzw. Überlebensraten aufwiesen als jene Zellen, die unter konstanten Temperaturbedingungen gehalten wurden. Dieser Effekt konnte in zwei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden. Die Ursache für die Ausreißer bei einer Konzentration von 200 μM H_2O_2 kann nicht mehr genau nachvollzogen werden. Möglicherweise kam es zu einem Pipettierfehler. In diesem Experiment wurden nur geringe Volumina (1 μl) der Wasserstoffperoxidlösung zu den Wells gegeben, wodurch eine visuelle Kontrolle der pipettierten Menge erschwert wird und sich die Gefahr erhöht, dass ein Tropfen der Lösung an der Wand des Wells verbleibt, ohne in Kontakt mit dem Zellmedium zu kommen.

Die großen Unterschiede im Überleben der Zellen weisen auf eine zentrale Rolle intakter circadianer Rhythmizität für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und der Resistenz gegenüber oxidativem Stress hin.

Damit reihen sich die Ergebnisse in eine Vielzahl von Befunden ein, welche die Bedeutung einer funktionierenden inneren Uhr für die Aufrechterhaltung basalster zellulärer Funktionen hervorheben.^{122,139,142,179,183,184,189,259} Akute und chronische Entzündungsprozesse sowie metabolische Störungen - mit erhöhtem oxidativen Stress als wichtigem pathogenetischen Faktor - sind nicht nur mitursächlich für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, sondern spielen auch eine zentrale Rolle in der Pathogenese anderer hochprävalenter Erkrankungen (wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, dem Metabolischen Syndrom, Typ II- Diabetes, Autoimmunerkrankungen, Osteoporose, einigen Krebsformen, nichtalkoholischer Fettleber und Depressionen)^{171,174-177}. Daher haben

die Ergebnisse dieses Experiments große Implikationen für das Verständnis und die Therapie einer Vielzahl scheinbar „distinkter“ Krankheitsentitäten.

In einem ersten Schritt böte sich hier der Versuch an, das Experiment mit verschiedenen Zellen nichtneuronalen Ursprungs zu wiederholen, um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse replizieren lassen.

4.4 Implikationen für die Durchführung von Zellkulturstudien

Die vorliegenden Ergebnisse bilden einen Baustein, um die Rolle circadianer Störungen in der Pathogenese von Krankheiten besser zu verstehen. Aber sie weisen auch auf eine weitverbreitete Vernachlässigung chronobiologischer Erkenntnisse in herkömmlichen Studien mit Zellkulturen hin.

Obwohl es weithin bekannt ist, dass die Körpertemperatur von Säugetieren im Tagesverlauf regelmäßigen Schwankungen unterliegt, hat der Großteil der in Labors genutzten Inkubatoren nicht die Möglichkeit zur zeitlichen Programmierung von Temperaturveränderungen. Daraus ist abzuleiten, dass die Zellen in den meisten Zellkulturstudien konstanten Temperaturbedingungen ausgesetzt sein dürften.

Ebenso finden sich in typischen biomedizinischen Studienprotokollen nur äußerst selten Aussagen über den Zeitpunkt des Mediumwechsels, den Zeitpunkt der Zugabe von Noxen oder den Zeitpunkt der jeweils vorgenommenen Analyse. Dasselbe trifft auch auf Studien an Versuchstieren und sogar klinische Studien an Menschen zu.

Es scheint also, als würde der Faktor „Zeit“ in der biomedizinischen Forschung systematisch ignoriert werden. Dies ist insofern problematisch, da bereits seit Jahrzehnten bekannt ist, welche zentrale Rolle circadiane Rhythmen über alle biologischen Domänen hinweg in vivo einnehmen. Auch ist bekannt, dass in vitro Zellen eine robuste circadiane Rhythmizität -beispielsweise bei der Genexpression – aufweisen und dass Faktoren wie der Mediumwechsel oder Temperaturveränderungen als Zeitgeber fungieren und die Zellen synchronisieren können.^{256,257,260}

Es hat sich gezeigt, dass in Zellen, welche typischen Kulturbedingungen (Dunkelheit, konstant 37 °C, konstanter CO₂-Gehalt der Luft) ausgesetzt sind, die individuelle circadiane Rhythmizität zwar aufrecht erhalten wird, dass jedoch die Synchronizität zwischen den Zellen schnell verloren geht.^{260,261} Menschen und Tiere weisen selbst unter Bedingungen ohne äußere Zeitgeber eine starke circadiane Rhythmizität in ihren Aktivitäten und Stoffwechselfvorgängen auf, welche in der Lage sind, die Körperzellen zu synchronisieren. Daher ist davon auszugehen, dass eine Desynchronisierung, wie sie in der Zellkultur auftritt, ein höchst unphysiologischer Zustand ist und dass die Daten, welche aus Studien mit desynchronisierten Zellkulturen abgeleitet wurden, äußerst defizitär sind.

Aufwändige Untersuchungen, bei denen unterschiedliche Gewebearten aus Mäusen bzw. Primaten entnommen wurden, zeigen, dass ein großer Teil der Gene in vivo rhythmisch transkribiert bzw. exprimiert wird. So zeigte sich an einer Untersuchung an Mäusen, dass 43% aller Gene, welche für Proteine kodieren, irgendwo im Körper einer Maus rhythmisch exprimiert werden.¹²⁷

Eine Untersuchung an Pavianen, welche Menschen nicht nur entwicklungsgeschichtlich

näher stehen, sondern wie wir tagaktiv sind, zeigten gar, dass über 80% all jener Gene, die für Proteine kodieren, rhythmisch exprimiert werden. Die Autoren kommen zu dem Schluss:

*„The daily expression rhythms in >80% of protein-coding genes, encoding diverse biochemical and cellular functions, constitutes by far the largest regulatory mechanism that integrates diverse biochemical functions within and across cell types. From a translational point of view, rhythmicity may have a major impact in health because 82.2% of genes coding for proteins that are identified as druggable targets by the U.S. Food and Drug Administration show cyclic changes in transcription.“*²⁶²

Den Faktor „Zeit“ bzw. „Timing“ in biomedizinischen (Zellkultur)studien nicht zu beachten heißt demnach, den „mit Abstand wichtigsten Mechanismus zur Integration biochemischer zellulärer Funktionen [eigene Übersetzung]“²⁶² zu ignorieren. Diese weitverbreitete Ignoranz ist wohl eine direkte Folge der Metapher von der „Natur als Maschine. Schließlich ist es einer Maschine egal, ob sie morgens um 2 Uhr oder um 15 Uhr am Nachmittag ihre Arbeit zu verrichten hat, während dieser Unterschied für den Menschen enorm sein kann.“^{263,264}

Die jahrzehntelange systematische Vernachlässigung einer derart grundlegenden biologischen Realität wie der „Zeit“ weist deutlich darauf hin, wie sehr das Denkparadigma von der „Natur als Maschine“ (siehe Abschnitt 1.1) unseren Erkenntnisfortschritt immer noch behindert. Dies zeigt uns, ebenso wie die vielfältigen ökologischen und sozialen Herausforderungen, mit denen wir aktuell konfrontiert sind, wie wichtig es ist, endlich einen Perspektivwechsel vorzunehmen, damit wir uns als Menschen, genau wie den Rest der Natur, wieder als ein untrennbar miteinander verwobenes, allverbundenes Konglomerat von Beziehungen begreifen können.

5 Literaturverzeichnis

1. Goethe, J. W. von & Becker, H.-J. *Goethes Biologie: die wissenschaftlichen und die autobiographischen Texte*. (Königshausen & Neumann, 1999).
2. COVID-19: Public Health Policy, Interventions and Populations: Co-Hosted with Penn Club, Yale Club, and Brown Club – Princeton Club of Northern California. <https://pcnc.org/events/covid-19-public-health-policy-interventions-and-populations-co-hosted-with-penn-club-yale-club-and-brown-club/>.
3. Kuhn, T. S. & Hacking, I. *The structure of scientific revolutions*. (The University of Chicago Press, 2012).
4. Okasha, S. *Philosophy of science: a very short introduction*. (Oxford University Press, 2016).
5. Hamilton, C. The Anthropocene as rupture. *The Anthropocene Review* **3**, 93–106 (2016).
6. Schellnhuber, H. j. 'Earth system' analysis and the second Copernican revolution. *Nature* **402**, C19 (1999).
7. 2001 Amsterdam Declaration on Earth System Science - IGBP. <http://www.igbp.net/about/history/2001amsterdamdeclarationonearthsystemscience.4.1b8ae20512db692f2a680001312.html>.
8. The Geological Society of London - History of the Gaia Network. <https://www.geolsoc.org.uk/Groups-and-Networks/Specialist-Groups/Earth-System-Science-Group/Group-History>.
9. Vignieri, S. & Fahrenkamp-Uppenbrink, J. Ecosystem Earth. *Science* **356**, 258–259 (2017).
10. Lovelock, J. Gaia: The living Earth. *Nature* **426**, 769–770 (2003).
11. Press, T. M. Scientists Debate Gaia. *The MIT Press* <https://mitpress.mit.edu/books/scientists-debate-gaia>.
12. Boston, P. J. Gaia Hypothesis. in *Encyclopedia of Ecology* (eds. Jørgensen, S. E. & Fath, B. D.) 1727–1731 (Academic Press, 2008). doi:10.1016/B978-008045405-4.00735-7.
13. Woese, C. R. A New Biology for a New Century. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 173–186 (2004).
14. Bizzarri, M., Palombo, A. & Cucina, A. Theoretical aspects of Systems Biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **112**, 33–43 (2013).
15. Vidal, M. A unifying view of 21st century systems biology. *FEBS Letters* **583**, 3891–3894 (2009).
16. Marques, V. & Brito, C. THE RISE AND FALL OF THE MACHINE METAPHOR: ORGANIZATIONAL SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN MACHINES AND LIVING BEINGS. 35.
17. Capra, F. & Luisi, P. L. The Systems View of Life. *Cambridge Core* /core/books/systems-view-of-life/35186BA5B12161E469C4224B6076ADFE (2014) doi:10.1017/CBO9780511895555.

18. Witzany, G. & Baluška, F. Life's code script does not code itself: The machine metaphor for living organisms is outdated. *EMBO reports* **13**, 1054–1056 (2012).
19. Nicholson, D. J. Organisms≠Machines. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* **44**, 669–678 (2013).
20. Swimme, B. & Berry, T. *The universe story from the primordial flaring forth to the Ecozoic era*. (ISSR, 2010).
21. Horton, R. *et al.* From public to planetary health: a manifesto. *The Lancet* **383**, 847 (2014).
22. Amel, E., Manning, C., Scott, B. & Koger, S. Beyond the roots of human inaction: Fostering collective effort toward ecosystem conservation. *Science* **356**, 275–279 (2017).
23. Crist, E. Reimagining the human. *Science* **362**, 1242–1244 (2018).
24. Turner, D. P. *The Green Marble: Earth System Science and Global Sustainability*. (Columbia University Press, 2018).
25. Boldt, J. Machine metaphors and ethics in synthetic biology. *Life Sci Soc Policy* **14**, 12 (2018).
26. Goldberg, T. L. & Patz, J. A. The need for a global health ethic. *The Lancet* **386**, e37–e39 (2015).
27. René Descartes: *Œuvres, Discours de la méthode et Essais*. vol. VI (Léopold Cerf, 1902).
28. Lindemann, B. *Der Leib-Seele Dualismus im Wandel der Zeit*. (2018).
29. Bibeltext. <https://www.die-bibel.de/bibeln/online-bibeln/einheitsuebersetzung/bibeltext/>.
30. Lent, J. R. *The Patterning Instinct: a cultural history of humanity's search for meaning*. (Prometheus Books, 2017).
31. Descola, P. & Kauppert, M. *Jenseits von Natur und Kultur*. (Suhrkamp, 2013).
32. Weber, A. *Indigenialität*. (Nicolai Publishing & Intelligence GmbH, 2018).
33. The Cambridge Encyclopedia of Hunters and Gatherers | Social and cultural anthropology. *Cambridge University Press*
<https://www.cambridge.org/de/academic/subjects/anthropology/social-and-cultural-anthropology/cambridge-encyclopedia-hunters-and-gatherers>,
<https://www.cambridge.org/de/academic/subjects/anthropology/social-and-cultural-anthropology>.
34. Loy, D. *Nonduality: a study in comparative philosophy*. (Humanity Books, 2014).
35. *The Oxford Handbook of Hypo-egoic Phenomena*. vol. 1 (Oxford University Press, 2016).
36. Subramanian, S. G. & Ghogh, B. *Introduction to the Non-dualism Approach in Hinduism and its Connection to Other Religions and Philosophies*. <https://osf.io/te39p> (2020) doi:10.31219/osf.io/te39p.
37. Millière, R., Carhart-Harris, R. L., Roseman, L., Trautwein, F.-M. & Berkovich-Ohana, A. Psychedelics, Meditation, and Self-Consciousness. *Front. Psychol.* **9**, (2018).
38. Eisenstein, C. *Die schönere Welt, die unser Herz kennt, ist möglich*. (2017).
39. Margineanu, D. G. Neuropharmacology beyond reductionism – A likely prospect. *Biosystems* **141**, 1–9 (2016).
40. Mazzocchi, F. Complexity and the reductionism-holism debate in systems biology.

- Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**, 413–427 (2012).
41. Gallagher, R. & Appenzeller, T. Beyond Reductionism. *Science* **284**, 79–79 (1999).
 42. Barabási, A.-L. & Oltvai, Z. N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics* **5**, 101 (2004).
 43. Barabási, A.-L., Gulbahce, N. & Loscalzo, J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature Reviews Genetics* **12**, 56–68 (2011).
 44. Stapp, H. P. SSS-Matrix Interpretation of Quantum Theory. *Phys. Rev. D* **3**, 1303–1320 (1971).
 45. Lenton, T. M. & van Oijen, M. Gaia as a complex adaptive system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 683–695 (2002).
 46. Lenton, T. M. & Latour, B. Gaia 2.0. *Science* **361**, 1066–1068 (2018).
 47. Influences of EU forests on weather patterns: Final report — Climate-ADAPT. <https://climate-adapt.eea.europa.eu/metadata/publications/influences-of-eu-forests-on-weather-patterns-final-report>.
 48. Wright, J. S. *et al.* Rainforest-initiated wet season onset over the southern Amazon. *PNAS* (2017) doi:10.1073/pnas.1621516114.
 49. Loomis Aug. 4, I., 2017 & Pm, 2:45. Trees in the Amazon make their own rain. *Science | AAAS* <https://www.sciencemag.org/news/2017/08/trees-amazon-make-their-own-rain> (2017).
 50. Perkins Aug. 30, S., 2012 & Pm, 2:05. Amazon Seeds Its Own Rain. *Science | AAAS* <https://www.sciencemag.org/news/2012/08/amazon-seeds-its-own-rain> (2012).
 51. Pöhlker, C. *et al.* Biogenic Potassium Salt Particles as Seeds for Secondary Organic Aerosol in the Amazon. *Science* **337**, 1075–1078 (2012).
 52. Ent, R. J. van der, Savenije, H. H. G., Schaefli, B. & Steele-Dunne, S. C. Origin and fate of atmospheric moisture over continents. *Water Resources Research* **46**, (2010).
 53. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1749461312000048?via%3Dihub>.
 54. Gorzelak, M. A., Asay, A. K., Pickles, B. J. & Simard, S. W. Inter-plant communication through mycorrhizal networks mediates complex adaptive behaviour in plant communities. *AoB PLANTS* **7**, (2015).
 55. Jacob, E. B., Becker, I., Shapira, Y. & Levine, H. Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends in Microbiology* **12**, 366–372 (2004).
 56. Fisher, R. M., Henry, L. M., Cornwallis, C. K., Kiers, E. T. & West, S. A. The evolution of host-symbiont dependence. *Nature Communications* **8**, 15973 (2017).
 57. Gilbert, S. F., Sapp, J. & Tauber, A. I. A Symbiotic View of Life: We Have Never Been Individuals. *The Quarterly Review of Biology* **87**, 325–341 (2012).
 58. Goldenfeld, N. & Woese, C. Biology's next revolution. *Nature* **445**, 369 (2007).
 59. *Symbiosis as a source of evolutionary innovation - speciation and morphogen.* (Mit Press Ltd, 1991).
 60. Torres-Padilla, M.-E. On transposons and totipotency. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **375**, 20190339 (2020).
 61. Gilbert, C. & Cordaux, R. Viruses as vectors of horizontal transfer of genetic material in eukaryotes. *Current Opinion in Virology* **25**, 16–22 (2017).

62. Liu, H. *et al.* Widespread Horizontal Gene Transfer from Double-Stranded RNA Viruses to Eukaryotic Nuclear Genomes. *Journal of Virology* **84**, 11876–11887 (2010).
63. Chen, D.-S., Wu, Y.-Q., Zhang, W., Jiang, S.-J. & Chen, S.-Z. Horizontal gene transfer events reshape the global landscape of arm race between viruses and homo sapiens. *Scientific Reports* **6**, 26934 (2016).
64. Peacock, K. A. Symbiosis in Ecology and Evolution. in *Philosophy of Ecology* (eds. deLaplante, K., Brown, B. & Peacock, K. A.) vol. 11 219–250 (North-Holland, 2011).
65. Moran, N. A. Symbiosis. *Current Biology* **16**, R866–R871 (2006).
66. Stachowicz, J. J. Symbiosis. *BioScience* **61**, 326–327 (2011).
67. Suárez, J. 'The importance of symbiosis in philosophy of biology: an analysis of the current debate on biological individuality and its historical roots'. *Symbiosis* **76**, 77–96 (2018).
68. Blaisdell, A. P., Sawa, K., Leising, K. J. & Waldmann, M. R. Causal Reasoning in Rats. *Science* **311**, 1020–1022 (2006).
69. Chittka, L. & Niven, J. Are Bigger Brains Better? *Current Biology* **19**, R995–R1008 (2009).
70. Tomasello, M., Call, J. & Hare, B. Chimpanzees understand psychological states – the question is which ones and to what extent. *Trends in Cognitive Sciences* **7**, 153–156 (2003).
71. Cross, F. R. & Jackson, R. R. Representation of different exact numbers of prey by a spider-eating predator. *Interface Focus* **7**, 20160035 (2017).
72. Dunlap, A. S., Papaj, D. R. & Dornhaus, A. Sampling and tracking a changing environment: persistence and reward in the foraging decisions of bumblebees. *Interface Focus* **7**, 20160149 (2017).
73. Holekamp, K. E. & Benson-Amram, S. The evolution of intelligence in mammalian carnivores. *Interface Focus* **7**, 20160108 (2017).
74. Grasso, F. W. & Basil, J. A. The Evolution of Flexible Behavioral Repertoires in Cephalopod Molluscs. *BBE* **74**, 231–245 (2009).
75. Trewavas, A. The foundations of plant intelligence. *Interface Focus* **7**, 20160098 (2017).
76. Gagliano, M., Vyazovskiy, V. V., Borbély, A. A., Grimonprez, M. & Depczynski, M. Learning by Association in Plants. *Sci Rep* **6**, 1–9 (2016).
77. Trewavas, A. Plant intelligence: Mindless mastery. *Nature* **415**, 841–841 (2002).
78. Westerhoff, H. V. *et al.* Macromolecular networks and intelligence in microorganisms. *Front Microbiol* **5**, (2014).
79. Shapiro, J. A. Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* **38**, 807–819 (2007).
80. Lyon, P. The cognitive cell: bacterial behavior reconsidered. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
81. Maturana, H. R. & Varela, F. J. *Autopoiesis and Cognition: The Realization of the Living*. (Springer Netherlands, 1980). doi:10.1007/978-94-009-8947-4.
82. Keijzer, F. A. Evolutionary convergence and biologically embodied cognition.

Interface Focus **7**, 20160123 (2017).

83. Waal, F. B. M. de & Ferrari, P. F. Towards a bottom-up perspective on animal and human cognition. *Trends in Cognitive Sciences* **14**, 201–207 (2010).
84. van Duijn, M. Phylogenetic origins of biological cognition: convergent patterns in the early evolution of learning. *Interface Focus* **7**, 20160158 (2017).
85. Lyon, P. The biogenic approach to cognition. *Cogn Process* **7**, 11–29 (2006).
86. Solé, R., Moses, M. & Forrest, S. Liquid brains, solid brains. *Phil. Trans. R. Soc. B* **374**, 20190040 (2019).
87. Chopra, D. Physics Must Evolve Beyond the Physical. *Acta Neuro Super* **61**, 126–129 (2019).
88. Henry, R. C. The mental Universe. *Nature* **436**, 29–29 (2005).
89. Kafatos, B. K., Henry P. Stapp, Menas C. Coming to Grips with the Implications of Quantum Mechanics. *Scientific American Blog Network*
<https://blogs.scientificamerican.com/observations/coming-to-grips-with-the-implications-of-quantum-mechanics/>.
90. Sapolsky, R. M. *Behave: the biology of humans at our best and worst*. (Penguin Press, 2017).
91. Gaab, J. The placebo and its effects: A psychoneuroendocrinological perspective. *Psychoneuroendocrinology* **105**, 3–8 (2019).
92. Rohleder, N. Stress and inflammation – The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects. *Psychoneuroendocrinology* **105**, 164–171 (2019).
93. Wilhelm, M., Winkler, A., Rief, W. & Doering, B. K. Effect of placebo groups on blood pressure in hypertension: a meta-analysis of beta-blocker trials. *Journal of the American Society of Hypertension* **10**, 917–929 (2016).
94. Kundakovic, M. & Jaric, I. The Epigenetic Link between Prenatal Adverse Environments and Neurodevelopmental Disorders. *Genes (Basel)* **8**, (2017).
95. Patel, V. *et al.* The Lancet Commission on global mental health and sustainable development. *The Lancet* **392**, 1553–1598 (2018).
96. Roenneberg, T., Allebrandt, K. V., Mellow, M. & Vetter, C. Social Jetlag and Obesity. *Current Biology* **22**, 939–943 (2012).
97. Wong, P. M., Hasler, B. P., Kamarck, T. W., Muldoon, M. F. & Manuck, S. B. Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk. *J Clin Endocrinol Metab* **100**, 4612–4620 (2015).
98. Roenneberg, T. & Klerman, E. B. Chronobiology. *Somnologie* **23**, 142–146 (2019).
99. Zhao, Y. *et al.* Molecular and Genetic Inflammation Networks in Major Human Diseases. *Mol Biosyst* **12**, 2318–2341 (2016).
100. Vidal, M., Cusick, M. E. & Barabási, A.-L. Interactome Networks and Human Disease. *Cell* **144**, 986–998 (2011).
101. Demaio, A. R. & Rockström, J. Human and planetary health: towards a common language. *The Lancet* **386**, e36–e37 (2015).
102. Nava, A., Shimabukuro, J. S., Chmura, A. A. & Luz, S. L. B. The Impact of Global Environmental Changes on Infectious Disease Emergence with a Focus on Risks for Brazil.

- ILAR J* **58**, 393–400 (2017).
103. Chaber, A.-L. The Era of Human-Induced Diseases. *EcoHealth* **15**, 8–11 (2018).
 104. Johnson, C. K. *et al.* Global shifts in mammalian population trends reveal key predictors of virus spillover risk. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**, 20192736 (2020).
 105. Sula-Raxhimi, E., Butzbach, C. & Brousselle, A. Planetary health: countering commercial and corporate power. *The Lancet Planetary Health* **3**, e12–e13 (2019).
 106. Swinburn, B. A. *et al.* The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *The Lancet* **393**, 791–846 (2019).
 107. *The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change*, <https://www.youtube.com/watch?v=iSmW1DEceic>, abgerufen am 03.06.2020. (2019).
 108. Keller, E. F. *The century of the gene*. (Harvard University Press, 2002).
 109. Maslin, M. A. & Lewis, S. L. Anthropocene: Earth System, geological, philosophical and political paradigm shifts. *The Anthropocene Review* **2**, 108–116 (2015).
 110. Kleinert, S. & Horton, R. Obesity needs to be put into a much wider context. *The Lancet* **393**, 724–726 (2019).
 111. Dodd, A. N. *et al.* Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* **309**, 630–3 (2005).
 112. Merrow, M., Spoelstra, K. & Roenneberg, T. The circadian cycle: Daily rhythms from behaviour to genes. **6**, 930–935 (2005).
 113. Paranipe, D. A. & Sharma, V. K. Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms* **3**, 1–13 (2005).
 114. Panda, S., Hogenesch, J. B. & Kay, S. A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–35 (2002).
 115. Pittendrigh, C. S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **25**, 159–184 (1960).
 116. E, B. Über die Erbllichkeit der Tagesperiodizität bei den Phaseolus-Blättern. *Jb wiss Bot* **81**, 411–418 (1932).
 117. Konopka, R. J. & Benzer, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2112–6 (1971).
 118. Young, M. W. & Kay, S. A. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* **2**, 702–15 (2001).
 119. Rosbash, M. The implications of multiple circadian clock origins. *PLoS Biol* **7**, e62 (2009).
 120. Takahashi, J. S. Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes Obes Metab* **17 Suppl 1**, 6–11 (2015).
 121. Nakajima, M. *et al.* Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* **308**, 414–5 (2005).
 122. Edgar, R. S. *et al.* Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* **485**, 459–464 (2012).
 123. Aschoff, J. Circadian Rhythms in Man. *Science* **148**, 1427–32 (1965).
 124. Krishnan, H. C. & Lyons, L. C. Synchrony and desynchrony in circadian clocks: impacts on learning and memory. *Learn Mem* **22**, 426–37 (2015).

125. Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P. S. Circadian control of the immune system. *13*, 190–198 (2013).
126. McAlpine, C. S. & Swirski, F. K. Circadian Influence on Metabolism and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res* **119**, 131–41 (2016).
127. Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E. & Hogenesch, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 16219–16224 (2014).
128. Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U. *The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks*. vol. 72 (2010).
129. Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. & Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975–8 (1990).
130. Stephan, F. K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 1583–6 (1972).
131. Ramkisoensing, A. & Meijer, J. H. Synchronization of Biological Clock Neurons by Light and Peripheral Feedback Systems Promotes Circadian Rhythms and Health. *Front Neurol* **6**, 128 (2015).
132. Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F., Jr. & Reppert, S. M. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* **19**, 1261–9 (1997).
133. Welsh, D. K., Takahashi, J. S. & Kay, S. A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* **72**, 551–77 (2010).
134. Mohawk, J. A., Green, C. B. & Takahashi, J. S. CENTRAL AND PERIPHERAL CIRCADIAN CLOCKS IN MAMMALS. *Annu Rev Neurosci* **35**, 445–462 (2012).
135. Damiola, F. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* **14**, 2950–2961 (2000).
136. Brown, S. A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N. & Schibler, U. Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. *Current Biology* **12**, 1574–1583 (2002).
137. DiMicco, J. A. & Zaretsky, D. V. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **292**, R47–R63 (2007).
138. Buhr, E. D., Yoo, S.-H. & Takahashi, J. S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* **330**, 379–385 (2010).
139. Kelly, R. M., Healy, U., Sreenan, S., McDermott, J. H. & Coogan, A. N. Clocks in the clinic: circadian rhythms in health and disease. *Postgraduate Medical Journal* **94**, 653–658 (2018).
140. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms | Nature Reviews Molecular Cell Biology. <https://www.nature.com/articles/s41580-019-0179-2>.
141. Zhang, S. L. & Sehgal, A. 11 - Circadian Rhythms and Disease. in *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)* (eds. Pyeritz, R. E.,

- Korf, B. R. & Grody, W. W.) 299–314 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-812536-6.00011-0.
142. Curtis, A. M. & Fitzgerald, G. A. Central and peripheral clocks in cardiovascular and metabolic function. *Ann. Med.* **38**, 552–559 (2006).
 143. Erkkinen, M. G., Kim, M.-O. & Geschwind, M. D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
 144. Kovacs, G. G. Chapter 21 - Concepts and classification of neurodegenerative diseases. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Kovacs, G. G. & Alafuzoff, I.) vol. 145 301–307 (Elsevier, 2018).
 145. *Merritt's neurology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2010).
 146. Pendlebury, W. W. The neuropathology of neurodegenerative diseases causing dementia. *Diagnostic Histopathology* **22**, 424–430 (2016).
 147. Dugger, B. N. & Dickson, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, (2017).
 148. Morris, G. P., Clark, I. A. & Vissel, B. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun* **2**, (2014).
 149. Jellinger, K. A. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**, 457–487 (2010).
 150. Armstrong, R. A., Lantos, P. L. & Cairns, N. J. Overlap between neurodegenerative disorders. *Neuropathology* **25**, 111–124 (2005).
 151. Spires-Jones, T. L., Attems, J. & Thal, D. R. Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* **134**, 187–205 (2017).
 152. Jellinger, K. A. & Attems, J. Challenges of multimorbidity of the aging brain: a critical update. *J Neural Transm (Vienna)* **122**, 505–521 (2015).
 153. Irwin, D. J. *et al.* Neuropathological and genetic correlates of survival and dementia onset in synucleinopathies: a retrospective analysis. *The Lancet Neurology* **16**, 55–65 (2017).
 154. Josephs, K. A. *et al.* Updated TDP-43 in Alzheimer's disease staging scheme. *Acta Neuropathol* **131**, 571–585 (2016).
 155. ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralbl. Nervenhe. Psych.* **18**, 177–179 (1907).
 156. Hippus, H. & Neundörfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* **5**, 101–108 (2003).
 157. The amyloid cascade hypothesis has misled the pharmaceutical industry. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 920–923 (2011).
 158. D'Alton, S. & George, D. R. Changing perspectives on Alzheimer's disease: thinking outside the amyloid box. *J. Alzheimers Dis.* **25**, 571–581 (2011).
 159. Krstic, D. & Knuesel, I. The airbag problem—a potential culprit for bench-to bedside translational efforts: relevance for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* **1**, 62 (2013).
 160. Das Manifest. <https://www.spektrum.de/thema/das-manifest/852357>.
 161. Mullane, K. & Williams, M. Alzheimer's disease (AD) therapeutics – 1: Repeated

- clinical failures continue to question the amyloid hypothesis of AD and the current understanding of AD causality. *Biochemical Pharmacology* **158**, 359–375 (2018).
162. Villoslada, P., Steinman, L. & Baranzini, S. E. Systems biology and its application to the understanding of neurological diseases. *Annals of Neurology* **65**, 124–139 (2009).
163. Castellani, R. J., Zhu, X., Lee, H.-G., Smith, M. A. & Perry, G. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Reductionist versus Expansionist Approaches. *Int J Mol Sci* **10**, 1386–1406 (2009).
164. Whitehouse, P. J. The End of Alzheimer's disease - from biochemical pharmacology to ecopsychosociology: a personal perspective. *Biochem Pharmacol* **88**, 677–681 (2014).
165. Kalia, L. V. & Lang, A. E. Parkinson's disease. *The Lancet* **386**, 896–912 (2015).
166. Kuiper, J. S. *et al.* Social relationships and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies. *Ageing Res. Rev.* **22**, 39–57 (2015).
167. Terracciano, A. *et al.* Personality and risk of Alzheimer's disease: New data and meta-analysis. *Alzheimers Dement* **10**, 179–186 (2014).
168. Khalsa, D. S. Stress, Meditation, and Alzheimer's Disease Prevention: Where The Evidence Stands. *J Alzheimers Dis* **48**, 1–12.
169. Medina-Remón, A., Kirwan, R., Lamuela-Raventós, R. M. & Estruch, R. Dietary patterns and the risk of obesity, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, asthma, and neurodegenerative diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58**, 262–296 (2018).
170. Cross Talk Between ER Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Health and Disease | SpringerLink. https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2522-3_15.
171. Fischer, R. & Maier, O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, (2015).
172. Reichmann, D., Voth, W. & Jakob, U. Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress. *Molecular Cell* **69**, 203–213 (2018).
173. Wood, L. B., Winslow, A. R. & Strasser, S. D. Systems Biology of Neurodegenerative Diseases. *Integr Biol (Camb)* **7**, 758–775 (2015).
174. Furman, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine* **25**, 1822–1832 (2019).
175. Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C. & Santoro, A. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology* **14**, 576–590 (2018).
176. Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E. & Sturmborg, J. P. Inflammation–Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases. *Front. Med.* **5**, (2018).
177. Couzin-Frankel, J. Inflammation Bares a Dark Side. *Science* **330**, 1621–1621 (2010).
178. Stephenson, J., Nutma, E., Valk, P. van der & Amor, S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* **154**, 204–219 (2018).
179. Man, K., Loudon, A. & Chawla, A. Immunity Around the Clock. *Science* **354**, 999–1003 (2016).
180. Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P. S. Circadian control of the immune

system. *Nat Rev Immunol* **13**, 190–8 (2013).

181. de Goede, P., Wefers, J., Brombacher, E. C., Schrauwen, P. & Kalsbeek, A. Circadian rhythms in mitochondrial respiration. *J Mol Endocrinol* **60**, R115–R130 (2018).

182. Manella, G. & Asher, G. The Circadian Nature of Mitochondrial Biology. *Frontiers in Endocrinology* **7**, (2016).

183. Loehfelm, A., Boucsein, A., Pretz, D. & Tups, A. Timing Matters: Circadian Effects on Energy Homeostasis and Alzheimer's Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **30**, 132–143 (2019).

184. Panda, S. Circadian physiology of metabolism. *Science* **354**, 1008–1015 (2016).

185. Reinke, H. & Asher, G. Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 227–241 (2019).

186. Green, C. B., Takahashi, J. S. & Bass, J. The Meter of Metabolism. *Cell* **134**, 728–742 (2008).

187. Futter, C. E. The molecular regulation of organelle transport in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Pigment Cell Research* **19**, 104–111 (2006).

188. Desvergne, A. & Friguet, B. Circadian Rhythms and Proteostasis in Aging. in *Circadian Rhythms and Their Impact on Aging* (eds. Jazwinski, S. M., Belancio, V. P. & Hill, S. M.) 163–191 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-64543-8_8.

189. Ryzhikov, M. *et al.* Diurnal Rhythms Spatially and Temporally Organize Autophagy. *Cell Reports* **26**, 1880-1892.e6 (2019).

190. Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H. & Ahmad, N. Circadian Rhythm Connections to Oxidative Stress: Implications for Human Health. *Antioxid Redox Signal* **19**, 192–208 (2013).

191. Putker, M. & O'Neill, J. S. Reciprocal Control of the Circadian Clock and Cellular Redox State - a Critical Appraisal. *Mol Cells* **39**, 6–19 (2016).

192. Kondratova, A. A. & Kondratov, R. V. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 325–335 (2012).

193. Phan, T. X. & Malkani, R. G. Sleep and circadian rhythm disruption and stress intersect in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Stress* **10**, 100133 (2019).

194. Wulff, K., Gatti, S., Wettstein, J. G. & Foster, R. G. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 589–599 (2010).

195. Clark, G. T. *et al.* Circadian control of heparan sulfate levels times phagocytosis of amyloid beta aggregates. *PLoS Genet* **18**, e1009994 (2022).

196. Musiek, E. S. *et al.* Circadian Rest-Activity Pattern Changes in Aging and Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* **75**, 582–590 (2018).

197. Rothman, S. M. & Mattson, M. P. Sleep Disturbances in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Neuromol Med* **14**, 194–204 (2012).

198. Schlosser Covell, G. E. *et al.* Disrupted daytime activity and altered sleep-wake patterns may predict transition to mild cognitive impairment or dementia: a critically appraised topic. *Neurologist* **18**, 426–429 (2012).

199. Tranah, G. J. *et al.* Circadian activity rhythms and risk of incident dementia and mild cognitive impairment in older women. *Annals of Neurology* **70**, 722–732 (2011).

200. Bokenberger, K. *et al.* Shift work and risk of incident dementia: a study of two population-based cohorts. *Eur J Epidemiol* **33**, 977–987 (2018).
201. Videnovic, A. *et al.* Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease. *JAMA Neurol* **71**, 463–469 (2014).
202. Ju, Y.-E. S. *et al.* Slow wave sleep disruption increases cerebrospinal fluid amyloid- β levels. *Brain* **140**, 2104–2111 (2017).
203. Ambrée, O. *et al.* Activity changes and marked stereotypic behavior precede A β pathology in TgCRND8 Alzheimer mice. *Neurobiology of Aging* **27**, 955–964 (2006).
204. Minakawa, E. N. *et al.* Chronic sleep fragmentation exacerbates amyloid β deposition in Alzheimer's disease model mice. *Neuroscience Letters* **653**, 362–369 (2017).
205. Sterniczuk, R., Dyck, R. H., LaFerla, F. M. & Antle, M. C. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes. *Brain Research* **1348**, 139–148 (2010).
206. Benedict, C. *et al.* Acute Sleep Deprivation Increases Serum Levels of Neuron-Specific Enolase (NSE) and S100 Calcium Binding Protein B (S-100B) in Healthy Young Men. *Sleep* **37**, 195–198 (2014).
207. Lucey, B. P. *et al.* Effect of sleep on overnight CSF amyloid- β kinetics. *Ann Neurol* **83**, 197–204 (2018).
208. Gu, Z. *et al.* Association of *ARNTL* and *PER1* genes with Parkinson's disease: a case-control study of Han Chinese. *Scientific Reports* **5**, 15891 (2015).
209. Association between *ARNTL* (*BMAL1*) rs2278749 polymorphism T > C and susceptibility to Alzheimer disease in a Chinese population. *GMR | Genetics and Molecular Research | The Original by FUNPEC-RP* <https://www.geneticsmr.com/articles/5862> (2016).
210. Chen, H., Huang, C., You, C., Wang, Z.-R. & Si-qing, H. Polymorphism of *CLOCK* Gene rs 4580704 C > G Is Associated with Susceptibility of Alzheimer's Disease in a Chinese Population. *Archives of Medical Research* **44**, 203–207 (2013).
211. Di Meco, A., Joshi, Y. B. & Praticò, D. Sleep deprivation impairs memory, tau metabolism, and synaptic integrity of a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neurobiology of Aging* **35**, 1813–1820 (2014).
212. de Vivo, L. *et al.* Ultrastructural Evidence for Synaptic Scaling Across the Wake/sleep Cycle. *Science* **355**, 507–510 (2017).
213. Leng, Y., Musiek, E. S., Hu, K., Cappuccio, F. P. & Yaffe, K. Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases. *The Lancet Neurology* **18**, 307–318 (2019).
214. Brüning, F. *et al.* Sleep-wake cycles drive daily dynamics of synaptic phosphorylation. *Science* **366**, (2019).
215. Musiek, E. S. *et al.* Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation* **123**, (2013).
216. Klebe, R.J., R., F. H. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol.* **43:69A**, (1969).
217. Tremblay, R. G. *et al.* Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods* **186**, 60–67 (2010).
218. Wang, G. *et al.* Caspase activation during apoptotic cell death induced by expanded

- polyglutamine in N2a cells. *NeuroReport* **10**, 2435–2438 (1999).
219. Jana, N. R., Zemskov, E. A., Wang, G. & Nukina, N. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* **10**, 1049–1059 (2001).
220. Butler, D. A. *et al.* Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *Journal of Virology* **62**, 1558–1564 (1988).
221. Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. & Taraboulos, A. Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform. *J. Biol. Chem.* **272**, 6324–6331 (1997).
222. Evangelopoulos, M. E., Weis, J. & Krüttgen, A. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene* **24**, 3309–3318 (2005).
223. Kalka, D. & Hoyer, S. Long-term cultivation of a neuroblastoma cell line in medium with reduced serum content as a model system for neuronal aging? *Arch Gerontol Geriatr* **27**, 251–268 (1998).
224. Dokmanovic, M., Clarke, C. & Marks, P. A. Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives. *Mol Cancer Res* **5**, 981–989 (2007).
225. Yan-Fang, T. *et al.* Molecular Mechanism of the Cell Death Induced by the Histone Deacetylase Pan Inhibitor LBH589 (Panobinostat) in Wilms Tumor Cells. *PLoS One* **10**, (2015).
226. Cain, J. E. *et al.* Sustained Low-Dose Treatment with the Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Induces Terminal Differentiation of Osteosarcoma Cells. *Sarcoma* **2013**, (2013).
227. Baud, M. O., Magistretti, P. J. & Petit, J.-M. Sustained sleep fragmentation affects brain temperature, food intake and glucose tolerance in mice: *Sleep fragmentation induces metabolic impairments*. *Journal of Sleep Research* **22**, 3–12 (2013).
228. Peach, M., Marsh, N. & MacPhee, D. J. Protein Solubilization: Attend to the Choice of Lysis Buffer. in *Protein Electrophoresis* (eds. Kurien, B. T. & Scofield, R. H.) vol. 869 37–47 (Humana Press, 2012).
229. Flaskos, J., McLean, W. G., Fowler, M. J. & Hargreaves, A. J. Tricresyl phosphate inhibits the formation of axon-like processes and disrupts neurofilaments in cultured mouse N2a and rat PC12 cells. *Neuroscience Letters* **242**, 101–104 (1998).
230. Fowler, M. J., Flaskos, J., McLean, W. G. & Hargreaves, A. J. Effects of neuropathic and non-neuropathic isomers of tricresyl phosphate and their microsomal activation on the production of axon-like processes by differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* **76**, 671–678.
231. Xiao, Q., Hu, X., Wei, Z. & Tam, K. Y. Cytoskeleton Molecular Motors: Structures and Their Functions in Neuron. *Int J Biol Sci* **12**, 1083–1092 (2016).
232. Lewis, S. A., Lee, M. G. & Cowan, N. J. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J. Cell Biol.* **101**, 852–861 (1985).
233. Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E. & Mörk, S. J. Class III β -Tubulin Isotype: A Key Cytoskeletal Protein at the Crossroads of Developmental Neurobiology and Tumor

- β -Tubulin Isotype: A Key Cytoskeletal Protein at the Crossroads of Developmental Neurobiology and Tumor Neuropathology. *J Child Neurol* **18**, 851–866 (2003).
234. Perrot, R., Berges, R., Bocquet, A. & Eyer, J. Review of the Multiple Aspects of Neurofilament Functions, and their Possible Contribution to Neurodegeneration. *Mol Neurobiol* **38**, 27–65 (2008).
235. Cleland, C. E. & Chyba, C. F. Defining 'life'. *Orig Life Evol Biosph* **32**, 387–393 (2002).
236. Duden | Stoff-wech-sel | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition.
<https://www.duden.de/rechtschreibung/Stoffwechsel>.
237. Kitadai, N. & Maruyama, S. Origins of building blocks of life: A review. *Geoscience Frontiers* **9**, 1117–1153 (2018).
238. MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay.
https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/multitox_fluor-multiplex-cytotoxicity-assay/.
239. MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay.
https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/multitox_glo-multiplex-cytotoxicity-assay/.
240. Fiskum, G., Kowaltowski, A. J., Andreyev, A. y., Kushnareva, Y. E. & Starkov, A. A. Apoptosis-Related Activities Measured with Isolated Mitochondria and Digitonin-Permeabilized Cells. in *Methods in Enzymology* vol. 322 222–234 (Elsevier, 2000).
241. Stochaj, U., Tissera, H., Kodiha, M. & Stochaj, U. Nuclear envelopes show cell-type specific sensitivity for the permeabilization with digitonin. *Protocol Exchange* (2010) doi:10.1038/protex.2010.211.
242. RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay- Technical Manual.
https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/realtime_glo-mt-cell-viability-assay/?catNum=G9711.
243. ThermoFischer: Technical Data Sheet Nunc F96 Microwell Plate, PS,
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/D03033.pdf>.
244. Corning Microplate Selection Product Line. *Sigma-Aldrich*
<https://www.sigmaaldrich.com/labware/corning-products/corning-plasticware/microplate-selection.html>.
245. Sies, H. Role of Metabolic H₂O₂ Generation. *J Biol Chem* **289**, 8735–8741 (2014).
246. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* **11**, 613–619 (2017).
247. Petralia, R. S., Mattson, M. P. & Yao, P. J. Communication breakdown: The impact of ageing on synapse structure. *Ageing Research Reviews* **14**, 31–42 (2014).
248. Adalbert, R. & Coleman, M. P. Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders: Age-related axon pathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **39**, 90–108 (2013).
249. Kesidou, E. *et al.* CNS Ageing in Health and Neurodegenerative Disorders. *JCM* **12**, 2255 (2023).
250. Du, X.-F. *et al.* Circadian regulation of developmental synaptogenesis via the hypocretinergic system. *Nat Commun* **14**, 3195 (2023).

251. Frank, M. Circadian Regulation of Synaptic Plasticity. *Biology* **5**, 31 (2016).
252. Shimosaki, K. Involvement of Nuclear Receptor REV-ERB β in Formation of Neurites and Proliferation of Cultured Adult Neural Stem Cells. *Cell Mol Neurobiol* **38**, 1051–1065 (2018).
253. White, M. G. *et al.* Cellular mechanisms of neuronal damage from hyperthermia. in *Progress in Brain Research* vol. 162 347–371 (Elsevier, 2007).
254. Hossain, M. E. *et al.* Direct exposure to mild heat promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells in vitro. *PLoS ONE* **12**, e0190356 (2017).
255. Farashi, S. & Sharifi, E. Stem Cell Behavior at Hypothermia: A Review Article. *CSCR* **16**, 718–729 (2021).
256. Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell* **93**, 929–937 (1998).
257. Ndikung, J. *et al.* Restoring circadian synchrony in vitro facilitates physiological responses to environmental chemicals. *Environment International* **134**, 105265 (2020).
258. Franco, R. & Vargas, M. R. Redox Biology in Neurological Function, Dysfunction, and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling* **28**, 1583–1586 (2018).
259. Eckel-Mahan, K. & Sassone-Corsi, P. Metabolism and the Circadian Clock Converge. *Physiol Rev* **93**, 107–135 (2013).
260. Nagoshi, E. *et al.* Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts: Cell-Autonomous and Self-Sustained Oscillators Pass Time to Daughter Cells. *Cell* **119**, 693–705 (2004).
261. Noguchi, T., Wang, L. L. & Welsh, D. K. Fibroblast PER2 Circadian Rhythmicity Depends on Cell Density. *J Biol Rhythms* **28**, 183–192 (2013).
262. Mure, L. S. *et al.* Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* **359**, (2018).
263. Lin, X. *et al.* Night-shift work increases morbidity of breast cancer and all-cause mortality: a meta-analysis of 16 prospective cohort studies. *Sleep Medicine* **16**, 1381–1387 (2015).
264. Jørgensen, J. T., Karlsen, S., Stayner, L., Andersen, J. & Andersen, Z. J. Shift work and overall and cause-specific mortality in the Danish nurse cohort. *Scand J Work Environ Health* **43**, 117–126 (2017).

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Stephan Englberger, geboren am 10.05.1989 in Weilheim in Oberbayern, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Circadiane Rhythmen und Ihr Einfluss auf die Überlebensfähigkeit, Differenzierung und Stressresistenz eines Zellkulturmodells für gealterte Nervenzellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Weilheim, den 03.04.2024

Stephan Englberger

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Mirjam Geibel bedanken, welche die Erstellung dieser Arbeit vom ersten Tag an mit großem Engagement, Wissen und Geduld begleitet hat und mich in allen Belangen bei Experimenten, Auswertung, Interpretation und den früheren Stadien des Manuskripts unterstützt hat .

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Martha Merrow bedanken, deren spürbare Begeisterung für Circadiane Rhythmen und Naturwissenschaft im Allgemeinen mich dazu bewegt hat, mich an ihrem Institut für die vorliegende Doktorarbeit zu bewerben. Ihre konstruktiven Fragen und Vorschläge sowie ihre Unterstützung haben mir sehr dabei geholfen, das Fachgebiet und die Experimente zu verstehen.

Mein Dank gilt aber auch den vielen Mitarbeitenden im Institut für Medizinische Psychologie, die mich in die Labortechnik eingewiesen haben, immer für Fragen zur Verfügung standen und mit denen ich so manche angenehme Stunden in familiärer Atmosphäre bei gemeinsamen Mittagessen und Feiern verbringen durfte.

Ich bin ebenfalls dankbar für die Förderung der Arbeit durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität München, ohne welches die Planung und Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich ganz besonders auch meiner Frau Jana danken. Ich bin dankbar dafür, dass sie mich überzeugt hat, mein Abitur nachzuholen und dafür, dass sie mich während der experimentellen und der schreibenden Phase der Arbeit unterstützt hat. Am dankbarsten bin ich aber dafür, dass sie nicht müde wurde, mich mit ihrer großen intuitiven Intelligenz davon zu überzeugen, dass die Welt mehr ist, als ich mir mit meinem damaligen reduktionistischen und rationalistischen Weltbild vorstellen konnte. Du bist ja so viel schlauer als ich!